

N° D'ORDRE :
622

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

Y. MÉNORET

Ingénieur Agronome

1^{re} THÈSE. — ACTION DE L'ACIDE 2.4.DICHLOROPHÉNOXY-
ACÉTIQUE SUR LE MÉTABOLISME AZOTÉ DES
TISSUS DE CAROTTE CULTIVÉS *IN VITRO*.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 23 Janvier 1960 devant la Commission d'examen.

MM. GAUTHERET
ULRICH
MONOD

Président.

} *Examineurs.*

IMPRIMERIE ALÉNÇONNAISE
PLACE POULET - MALASSIS
ALÉNÇON (ORNE)

1960

N° D'ORDRE :
622

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

Y. MÉNORET

Ingénieur Agronome

1^{re} THÈSE. — ACTION DE L'ACIDE 2.4.DICHLOROPHÉNOXY-
ACÉTIQUE SUR LE MÉTABOLISME AZOTÉ DES
TISSUS DE CAROTTE CULTIVÉS *IN VITRO*.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 23 Janvier 1960 devant la Commission d'examen.

MM. GAUTHERET
ULRICH
MONOD

Président.

} *Examineurs.*



IMPRIMERIE ALENÇONNAISE
PLACE POULET - MALASSIS
ALENÇON (ORNE)

1960

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen. J. PÉRÈS

PROFESSEURS

G. JULIA	T Analyse supérieure et T Algèbre supérieure.	JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste.
DE BROGLIE	T Théories physiques.	VASSY	T Physique de l'atmosphère
PRENANT	T Anatomie et histologie comparées.	DESTOUCHES	T Théories physiques.
PÉRÈS	T Mécanique des fluides et applications.	PRUVOST	T Géologie.
BARRABÉ	T Géologie structurale et Géologie appliquée.	AMIEL	T Chimie générale.
BOURCART	T Géographie physique et Géologie dynamique.	HOCART	T Minéralogie.
PLANTEFOL	T Botanique.	J.-P. MATHIEU	T Physique (Orsay).
GRASSÉ	T Évolution des êtres orga- nisés.	COUTEAUX	T Biol. animale (P.C.B.).
PRÉVOST	T Chimie organique.	MAY	T Zoologie (Orsay).
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la Géométrie.	CHOQUET	T Théorie des fonctions et Topologie.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	FELDMANN	T Biologie végétale marine.
WYART	T Minéralogie.	GUINIER	T Physique des Solides
TEISSIER	T Zoologie.	JOST	T Physiologie comparée.
MANGENOT	T Biologie végétale.	FORTET	T Calcul des probabilités et physique mathématique.
P. AUGER	T Physique quantique et relativité.	SCHWARTZ	T Calc. diff. et Intégral.
MONNIER	T Physiologie générale.	CHOUARD	T Physiologie végétale.
PIVETEAU	T Paléontologie.	MALAVARD	T Aviation.
ROCARD	T Physique (E.N.S.).	BRELOT	T Calcul différentiel.
H. CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.).	NORMANT	T Synthèse organique.
LAFFITTE	T Chimie générale.	BÉNARD	T Chimie minérale.
FAVARD	T Géométrie supérieure	BUVAT	T Botanique (E.N.S.).
COULOMB	T Physique du Globe.	DUGUÉ	T Statistiques mathéma- tiques.
M ^{lle} COUSIN	T Biologie animale (S.P.C.N.)	GÉLOSO	T Chimie (S.P.C.N.).
CHRÉTIEN	T Chimie minérale.	SOULAIRAC	T Psychophysiologie.
P. DRACH	T Zoologie.	ULRICH	T Physiologie végétale.
KASTLER	T Physique (E.N.S.).	MARÉCHAL	T Optique théorique et appliquée.
EPHRUSSI	T Génétique.	KIRRMANN	T Théories chimiques.
WURMSER	T Biol. physico-chimique.	CHADEFAUD	T Botanique.
RIVIÈRE	T Géologie (S.P.C.N.), Orsay.	M ^{lle} LE BRETON	T Physiologie générale.
GAUTHÉRET	T Biologie végétale (P.C.B.).	SALEM	T Mathématiques générales.
LUCAS	T Recherches physiques.	LELONG	T Mathématiques générales.
A. THOMAS	T Biologie cellulaire.	DEVILLERS	T Anatomie et Histologie comparées.
ARNULF	T Optique appliquée.	EHRESMANN	T Topologie algébrique.
M. MORAND	T Enseignement de Physique	FRANÇON	T Physique (S.P.C.N.).
SOLEILLET	T Physique (P.C.B.).	GLANGEAUD	T Géographie physique et Géologie dynamique.
FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides.	GODEMENT	T Mathématiques (M.G.P.).
DANJON	T Astronomie	PISOT	T Techniques mathéma- tiques de la Physique.
PETIT	T Biologie maritime.	ROCH (E.)	T Géologie.
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique.	SCHATZMANN	T Astrophysique.
GALLIEN	T Embryologie.	TERMIER	T Paléontologie stratigra- phique.
EICHORN	T Biol. végétale (S.P.C.N.).	ZAMANSKY	T Mathématiques générales.
DE CUGNAC	T Biol. végétale (S.P.C.N.).	LENNUIER	T Physique (M.G.P.).
M ^{lle} CAUCHOIS	T Chimie physique.	RIZET	T Génétique.
THELLIER	T Physique du Globe.	ROUTHIER	T Géologie appliquée.
L'HÉRITIER	T Génétique	M ^{me} TONNELAT	T Relativité.
GRIVET	T Radio-Électricité.	DIXMIER	T Mathématiques (M.P.C.).
PONCIN	T Mécanique générale.	SOUCHAY	T Chimie générale.
DUBREIL	T Arithmétique et théorie des nombres.	AIGRAIN	T Electrotechnique générale.
QUELET	T Chimie organique.	BRUSSET	T Chimie minérale.
CAGNIARD	T Géophysique appliquée	M. LÉVY	T Physique théorique des hautes énergies.
CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire.	M ^{me} CHAIX	T Chimie biologique.
CUVILLIER	T Micropaléontologie	M ^{me} HUREL-PY	T Biol. végétale (P.C.B.).
JUNG	T Pétrographie.	PLAUX	T Chimie (M.P.C.).
TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique.	BRUN	T Mécanique expérimentale des fluides.
WIEMANN	T Chimie organique et structurale.	LEDERER	T Chimie biologique.
		M ^{me} DUBREIL	T Mathématiques.
		M ^{me} LELONG	T Mathématiques (E.N.S.).

BELLAIR	T Géologie (S.P.C.N.).	LENDER	Biologie animale (S.P.C.N.)
COTTE	T Physique (Orsay).		Orsay.
DUBOIS (J. E.)	T Chimie organique.	MAGAT	Physico-chimie des Rayon-
LAMOTTE	Zoologie (É.N.S.S.).		nements.
MICHEL André	T Chimie (S.P.C.N.).	Mlle QUINTIN	T Electrochimie.
OLMER	T Énergétique générale.	MONOD	T Chimie du métabolisme.
ROUAULT	T Physique générale.	BENOIT	T Physiologie animale.
GAUTHIER	T Mécanique appliquée.	DE POSSEL	T Analyse numérique.
BARCHEWITZ	T Chimie physique.	CHARLOT	T Chimie analytique.
BROSSEL	T Physique atomique.	HAISSINSKY	T Radiochimie.
BUSER	Physiologie comparée.	LEMÉE	T Physiologie (B.M.P.V.).
CAMUS	Physiol. végétale (3 ^e Cycle)	GUÉRIN	T Chimie (M.P.C.).
CASTAING	Physique générale.	CHATELET (M.) . . .	Chimie (S.P.C.N.).
CURIEN	Minéralogie et cristallo-	JEAN	Physique nucléaire et
	graphie.		Radioactivité.
MOYSE	T Physiol. végétale (Orsay).	MATTLER	Physique (S.P.C.N.).
PANNETIER	Chimie (S.P.C.N.).	MICHEL Louis	Physique théorique des
POSSOMPES	T Zoologie.		hautes énergies.
PULLMANN	Chimie théorique.	RUMPF	Chimie (P.C.B.).
TEILLAC	Physique nucléaire et	BERGERARD	Zoologie (Orsay).
	radioactivité.	BERTIN	Electronique.
TONNELAT	Biol. physico-chimique.	BOUSSIÈRES	Chimie des Radioéléments.
VILLE	T Économétrie.	M ^{me} COUTURE	Physique (P.C.B.).
WILLEMART	Chimie (P.C.B.).	ELLENBERGER	Géologie structurale et
DODÉ	T Chimie (S.P.C.N.), Orsay.		Géologie appliquée.
FREYMANN	T Physique générale.	FRANC	Biologie animale.
GUINOCHE	T Biol. végétale (Orsay).	SCHNELL	Botanique tropicale.
ROLLET	T Chimie (P.C.B.).	STOLKOWSKI	Physiologie générale.
Mlle JOSIEN	T Chimie (P.C.B.).	ACHER	Chimie biologique (Orsay).
CHEVALLEY	T Géométrie algébrique et	BAUDOUIN	Biologie animale (P.C.B.).
	théorie des groupes.	BEAUMONT	Biologie animale (S.P.C.N.)
ARNOULT	T Electronique.	BLAUMONT	Géophysique ionosphère.
CHAPELLE	T Physique (M.P.C.), Orsay.	BOURREAU	Biol. végétale (S.P.C.N.),
DELANGE	T Mathématiques (Orsay).		Orsay.
DENY	T Mathématiques (M.G.P.).	CURIE (D.)	Physique (M.G.P.).
GERMAIN	T Mécanique théorique des	DURAND-DELGA . . .	Géologie.
	fluides	FREON	Chimie (P.C.B.).
LUCAS (G.)	T Géologie	HELLER	Physiologie végétale.
ALLARD	Chimie physique.	TORTRAT	Calcul des Probabilités
BERTHELOT	Physique nucléaire et	CAILLEUX	Géologie (S.P.C.N.).
	Radioactivité.	MAGNAN	Physique (M.P.C.).
BRICARD	Météorologie et Physique	DAUDEL	Mécanique ondulatoire
	de l'Atmosphère.		appliquée à la chimie
M ^{me} ALBE-FESSARD . . .	Psychophysiologie.		théorique et à la Phy-
FRIEDEL	Physique des Solides		sique nucléaire.
M. JULIA	Étude des molécules orga-	Mlle FOURCROY . . .	Biol. végétale (S.P.C.N.).
	niques complexes.		

Secrétaire général. . . C. MONIER

ACTION DE L'ACIDE
2.4.DICHLOROPHÉNOXYACÉTIQUE
SUR LE MÉTABOLISME AZOTÉ
DES TISSUS DE CAROTTE CULTIVÉS
IN VITRO

par

Y. MÉNORET

Ingénieur Agronome
Ingénieur Docteur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ACTION DE L'ACIDE 2.4.DICHLOROPHÉNOXYACÉTIQUE SUR LE MÉTABOLISME AZOTÉ DES TISSUS DE CAROTTE CULTIVÉS *IN VITRO*

INTRODUCTION	5
HISTORIQUE	9
I. — Activité physiologique de l'AIA et du 2.4.D.	9
II. — Activité biochimique de l'AIA et du 2.4.D.	12

Première partie

TECHNIQUES

— Cultures de tissus <i>in vitro</i>	20
— Techniques chimiques	24
A. — <i>Techniques d'analyse et de dosage</i>	
— Chromatographie quantitative des acides aminés sur papier	
I. — <i>Les différentes méthodes de dosage des acides aminés</i>	24
II. — <i>Étude de la colorimétrie sur papier des acides aminés</i>	32
III. — <i>Chromatographie quantitative sur papier</i>	42
IV. — <i>Conclusions</i>	57
— Dosages spécifiques de l'arginine et de la proline	59
— Dosage de l'azote total	60
— Dosage des nitrates	61
— Chromatographie des acides organiques sur colonne de gel de silice	63
— Mesure de la radioactivité du ¹⁴ C.	64
B. — <i>Techniques d'extraction</i>	
— Extraction des acides aminés	
I. — <i>Étude de la résine Permutite 50</i>	68
II. — <i>Mode opératoire de l'extraction</i>	70
— Extraction des acides organiques	72

Deuxième partie

RÉSULTATS

Chapitre I. — ÉTUDE DU MATÉRIEL BIOLOGIQUE	
— Expérience préliminaire réalisée à l'aide d'ensemencements primaires de Carotte	
— <i>Mode opératoire</i>	74
— <i>Résultats</i>	74
— <i>Conclusion</i>	79

— Analyse des tissus de la racine de Carotte	80
— <i>Mode opératoire</i>	80
— <i>Résultats</i>	80
— Métabolisme azoté des tissus de Carotte cultivés <i>in vitro</i>	82
— <i>Analyse d'une culture âgée de 80 jours</i>	82
— <i>Évolution de la teneur en azote soluble et en azote total au cours de la culture in vitro</i>	83
— <i>Transplantation d'une culture sur un milieu neuf</i>	85
— <i>Conclusions</i>	87
Chapitre II. — ACTION COMPARÉE DE L'AIA ET DU 2.4.D SUR LE MÉTABOLISME AZOTÉ DES TISSUS CULTIVÉS <i>in vitro</i>	
— Étude de la fraction aminée soluble	
I. — <i>La transplantation sur le milieu au 2.4.D dure moins de 4 jours</i>	89
II. — <i>La transplantation dure 8 jours</i>	92
III. — <i>La transplantation est faite sur un milieu sans nitrate</i>	93
— Étude de la fraction protéique insoluble	
I. — <i>Cultures âgées de 7 semaines</i>	97
II. — <i>Cultures âgées de 3 semaines</i>	99
III. — <i>Conclusions</i>	99
Chapitre III. — ÉTUDE DE L'INCORPORATION D'ACIDES AMINÉS MARQUÉS AU ¹⁴ C DANS LES TISSUS CULTIVÉS EN PRÉSENCE DE 2.4.D OU D'AIA	101
— Métabolisme de la glycine 2- ¹⁴ C	
— <i>Mode opératoire</i>	102
— <i>Résultats</i>	103
— <i>Conclusions</i>	106
— Métabolisme de l'acide glutamique 3-4-di ¹⁴ C	
— <i>Mode opératoire</i>	107
— <i>Résultats</i>	109
— <i>Conclusion</i>	110
— Métabolisme de l'arginine uniformément marquée par le ¹⁴ C	
— <i>Mode opératoire</i>	111
— <i>Résultats</i>	113
— <i>Conclusions</i>	118
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	120
BIBLIOGRAPHIE.	124

INTRODUCTION

Parmi les nombreuses substances douées d'une action auxinique sur la croissance des végétaux, certaines ont pu être isolées ou au moins caractérisées avec certitude dans les tissus, comme l'acide indole-3-acétique (AIA) ou l'indole-3-acétonitrile : ce sont de véritables hormones. D'autres sont des molécules de synthèse dont l'action physiologique rappelle plus ou moins celle des substances naturelles. Elles sont vis-à-vis de celles-ci comme les œstrogènes de synthèse : stilbœstrol ou acide allénolique par exemple, par rapport aux hormones naturelles.

Leur activité pharmacodynamique a été mise à profit, en agriculture, dans des buts variés. C'est ainsi que l'on utilise l'acide indole-butyrique pour favoriser l'enracinement des boutures, l'acide α -naphtalène acétique et ses dérivés (ANA) pour retarder la chute des fruits ou au contraire pour provoquer la mise à fleur et à fruit. Enfin, l'acide 2.4.Dichlorophénoxyacétique (2.4.D) et ses dérivés sont couramment employés comme herbicides sélectifs.

De telles substances capables de contrôler des phénomènes apparemment aussi différents que l'induction de racines adventives, la parthénocarpie, la croissance et la division cellulaire, interviennent vraisemblablement au niveau de réactions essentielles du métabolisme de la cellule. A cet égard, on connaît depuis longtemps le rôle joué par les composés azotés sous leurs différentes formes minérale, organique, soluble et protéique, et on peut supposer que toute substance qui affecte la croissance et la division cellulaire a une influence sur le métabolisme de l'azote.

Des données préliminaires, fragmentaires, sont déjà instructives à cet égard. C'est ainsi que l'étude de la répartition de l'auxine (AIA) dans les tissus de la plante montre qu'elle est abondante là où la croissance par divisions cellulaires est la plus active, c'est-à-dire au

niveau des méristèmes de la tige et de la racine. Or, ces méristèmes sont des tissus riches en azote soluble et en azote protéique. D'autre part, les tissus tumoraux, riches aussi en azote total et protéique, sont également riches en auxine, à tel point qu'ils peuvent être cultivés indéfiniment *in vitro* sans apport extérieur de substance de croissance. Il semblerait donc que dans un tissu en voie de croissance rapide, une forte teneur en protéine et en azote soluble soit associée, souvent, à une forte concentration en auxine.

Une vue très suggestive de la relation qui existe *in vitro* entre la teneur en auxine et le métabolisme des substances azotées est fournie par la comparaison entre deux études faites sur le tubercule de Topinambour. En effet, KULESCHA a montré (42) que la teneur en auxine de cet organe, forte en été, diminuait en automne et restait très faible pendant la période de repos hivernal, pour augmenter lors de la germination. Or, DURANTON, dans une étude récente (20), trouve que la teneur en arginine libre qui constitue 90 p. 100 de l'azote soluble est soumise à des variations de sens inverse ; elle augmente à l'automne, reste à une forte valeur tout l'hiver, puis diminue au printemps. L'auxine aurait donc une action décisive sur la synthèse des protéines et cette action serait fonction de sa concentration dans les tissus.

Nous avons essayé de préciser, dans le travail exposé ici, la manière dont le 2.4.D affecte le métabolisme de l'azote et principalement l'équilibre entre les acides aminés libres et les protéines, sur un matériel biologique aussi simple que possible. En effet, un grand nombre d'expériences réalisées avec le 2.4.D ont porté sur des plantes entières, considérées comme un tout. Dans ces conditions, les phénomènes de transport de la substance de croissance d'un tissu à l'autre et le fait que notre connaissance des relations biochimiques entre les tissus et les organes d'une même plante est encore fort incomplète, rendent l'analyse de telles études très délicate.

C'est dans cet esprit que nous avons choisi comme matériel d'expérience les tissus de Carotte cultivés *in vitro* et plus précisément la souche de GAUTHERET, qui a déjà servi à plusieurs études de ce genre. Ces cultures donnent des réponses beaucoup moins complexes à analyser que celles d'une plante entière et ont, par contre, l'avantage d'être un matériel véritablement vivant, dont les cellules sont

capables de proliférer indéfiniment. Les critiques relatives à l'emploi de fragments de tiges ou de coléoptiles, comme dans les expériences de CHRISTIANSEN et THIMANN (14) ou BOROUGHS (9) ne peuvent donc leur être adressées.

* * *

Notre travail comporte, en premier lieu, l'examen détaillé de la technique de dosages des acides aminés par chromatographie sur papier, qui a été notre principal instrument d'analyse. Puis l'étude du métabolisme azoté des tissus de Carotte, frais ou cultivés *in vitro*, introduit l'étude pharmacodynamique du 2.4.D.

Celle-ci comprend la recherche de l'influence du 2.4.D à différentes doses et pendant des temps variables, sur la fraction aminée soluble et sur l'insoluble protéique de tissus cultivés *in vitro* dans des conditions normales. En dernier lieu, nous remplaçons les nitrates des milieux de culture par une solution d'un acide aminé (glycine, acide glutamique puis arginine) dont la molécule est marquée au ^{14}C , et essayons de voir si la nature de la source d'azote mise à la disposition des tissus conditionne leur réponse au 2.4.D.

* * *

Ce travail a été réalisé, au Centre d'Études du Bouchet, dans le laboratoire de M. Guy GARNIER, que nous tenons à remercier particulièrement car nous avons toujours trouvé auprès de lui un appui solide et une amitié éclairée. De même, nous avons été sensible à la compréhension de M. RICAUD, directeur du Service de Biologie et à la bienveillance de M. le Directeur du Centre.

A chaque étape de notre étude, M. Georges MOREL, Directeur de Recherches à l'Institut National de la Recherche Agronomique, nous a guidé et conseillé, nous faisant largement profiter de son expérience scientifique. Il a su nous faire découvrir ce qu'était la recherche, et nous lui en disons ici notre gratitude.

Nous devons également beaucoup à M. le Professeur GAUTHERET, membre de l'Institut, qui nous avait initié, voici déjà plusieurs années, à la culture des tissus végétaux, et qui a bien voulu accepter de constituer notre Jury avec MM. les Professeurs ULRICH et MONOD. Nous leur exprimons notre vive reconnaissance pour cet honneur qu'ils nous ont fait.

Nous n'oublions pas l'aide technique compétente que M^{me} LESAGE nous a apportée tout au long de notre travail; non plus que le concours amical et dévoué de M^{me} LANGLOIS et de MM. DARRET, DURANTON, MARTIN et PERDRIZET.

HISTORIQUE

Depuis une vingtaine d'années, un grand nombre de recherches ont été consacrées, sur les plantes ou les organes les plus divers, à l'étude du 2.4.D mais leurs conclusions paraissent peu cohérentes et WEINTRAUB (84) a pu les comparer aux pièces d'un jeu de puzzle dont les éléments principaux manqueraient encore.

Nous allons essayer cependant de situer le 2.4.D par rapport à l'auxine la plus répandue, l'acide indole acétique, sous l'angle de l'activité physiologique d'abord, puis de l'activité biochimique.

I. — ACTIVITÉ PHYSIOLOGIQUE DE L'AIA ET DU 2.4.D

La plupart des auteurs pensent qu'il est difficile d'établir une distinction entre les effets du 2.4.D et ceux de l'auxine.

Ainsi, d'après BONNER (7) quand on soumet l'acide indole acétique, l'acide naphthalène acétique (ANA) et le 2.4.D aux mêmes épreuves biologiques, on obtient des résultats le plus souvent comparables. Nous voyons, par exemple, d'après le tableau I, qu'ils ont un effet de même nature sur l'élongation du coléoptile d'avoine, l'induction des racines adventives et l'épinastie des feuilles. Le 2.4.D se montre incapable de provoquer la courbure du coléoptile d'avoine, mais est par contre plus actif que l'AIA sur l'enroulement de la tige de pois ; ces réponses apparemment contradictoires à deux épreuves d'élongation cellulaire tiennent vraisemblablement au fait que le 2.4.D et l'AIA ne migrent pas dans les tissus de la même manière.¹

D'un point de vue quantitatif, il faut noter que le 2.4.D est plus actif que l'AIA ou l'ANA sur les épreuves de prolifération cellulaire : on sait d'ailleurs que pour mettre en culture *in vitro* de

très petits fragments de phloème de racine de Carotte, de fortes doses de 2.4.D (6.10^{-6}) réussissent là où l'AIA se montre insuffisant (76).

TABEAU I

ACTIVITÉ PHYSIOLOGIQUE COMPARÉE DE L'ACIDE INDOLE ACÉTIQUE (AIA)
DE L'ACIDE NAPHTALÈNE ACÉTIQUE (ANA)
ET DE L'ACIDE 2.4.DICHLOROPHÉNOXYACÉTIQUE (2.4.D)
D'APRÈS BONNER J. : *Plant Biochemistry*, pp. 462-463

ÉPREUVE BIOLOGIQUE	AIA	ANA	2.4.D
Courbure du coléoptile d'Avoine . .	100	2,5	0
Élongation du coléoptile d'Avoine. .	100	15	300
Enroulement de la tige de Pois (Pea test de Went).	100	370	200-1 200
Induction de racines adventives sur plusieurs espèces.	100	150	1 500
Épinastie mesurée d'après l'angle pé- tiole/tige sur Tomate	100	100	100
Inhibition des bourgeons latéraux sur plusieurs espèces.	100	100	—
Inhibition de la croissance de la racine d'Avoine	100	4	30
Effets morphogènes sur Tomate. . .	inactif	actif	actif

Cependant une différence importante est que le 2.4.D est un herbicide puissant, tandis que l'AIA n'a jamais été utilisé comme tel. Sans doute, les doses nécessaires pour obtenir cet effet herbicide sont d'un autre ordre de grandeur que les doses physiologiques et, en réalité, toutes les substances de croissance sont toxiques lorsqu'on les utilise à des doses élevées. Mais pour certaines l'activité croît en fonction de la concentration plus vite que pour d'autres : ainsi d'après VAN OVERBEEK, BLONDEAU et HORNE (64), même bien avant d'atteindre le seuil de toxicité, le 2.4.D est plusieurs fois plus actif que l'AIA.

Les conditions dans lesquelles une substance de croissance pénètre dans l'organisme végétal et migre dans les différents tissus, ainsi que sa plus ou moins grande stabilité vis-à-vis des systèmes enzymatiques, déterminent pour une part importante son efficacité herbicide. Or, on sait que l'enzyme qui est généralement tenue pour responsable de la régulation de la teneur des tissus en auxine, l'oxydase de l'acide indole acétique, est inactive sur la molécule

de 2.4.D : celle-ci a donc une « vie » biologique plus longue. Des études faites à l'aide de 2.4.D marqué en diverses positions par le ^{14}C ont montré (24) qu'il pénètre rapidement la cuticule, diffuse dans le mésophylle pour être ensuite véhiculé à travers le phloème avec la sève à une vitesse pouvant atteindre 10 cm/h. Certes, au bout d'un temps variable, on observe un dégagement de $^{14}\text{CO}_2$, ce qui constitue la preuve d'une transformation de la molécule de 2.4.D, bien que l'oxydase de l'AIA n'intervienne pas dans cette destruction (84), mais cette disparition est variable suivant les tissus et les espèces végétales. On peut d'ailleurs concevoir que la sélectivité du 2.4.D est en relation avec l'aptitude plus ou moins grande de la plante traitée à le véhiculer et à le détruire. Dans ce sens, on a signalé que la diffusion du 2.4.D est plus rapide dans les plantules (24) qui sont aussi plus sensibles au 2.4.D et que les monocotylédones, moins sensibles, absorbent l'acide 2.4.D plus lentement que les dicotylédones.

La diffusion à travers les tissus conducteurs de la plante est un trait caractéristique de tous les herbicides hormonaux. CRAFTS (18) a remarqué que le 2.4.D affecte peu les cellules adultes, qui constituent en majorité les tissus responsables de son absorption et de sa translocation, tandis qu'il perturbe gravement le métabolisme des cellules jeunes des zones méristématiques où il s'accumule, occasionnant ainsi un accroissement de l'absorption d'eau, de la turgescence et de la respiration, ainsi que des divisions cellulaires anormales. Si le 2.4.D est métabolisé progressivement dans l'organisme végétal, il semble bien cependant qu'il jouisse d'une plus grande stabilité que l'AIA. D'autre part, dès 1945, NUTMAN, THORNTON et QUASTEL (61) trouvèrent que l'AIA et l'ANA sont rapidement détruits par les bactéries dans un sol normal, non stérilisé, tandis que le 2.4.D persiste beaucoup plus longtemps.

Il est donc raisonnable d'expliquer la plus grande toxicité du 2.4.D tant par le fait qu'il persiste plus longtemps dans le sol que par sa moindre labilité vis-à-vis des systèmes enzymatiques du tissu végétal : son temps de séjour atteindrait jusqu'à 26 jours dans la Tomate et le Pois (19).

Certains auteurs, cependant, pensent que la différence entre le 2.4.D et l'AIA est plus qu'une question de dose ou de stabilité

et que l'un des aspects les plus importants du rôle du 2.4.D serait de modifier la répartition de l'auxine endogène dans la plante traitée. Ainsi WEINTRAUB (84) et ses collaborateurs pensent que le 2.4.D se comporte dans certains cas comme une anti-auxine : WEINTRAUB a montré, en particulier, qu'un traitement au 2.4.D diminue très rapidement la teneur en auxine des bourgeons de Haricot et que cette diminution est proportionnelle à la dose employée. La nature du mécanisme par lequel le 2.4.D provoque ce résultat est inconnue et l'on ignore si la diminution observée provient d'une plus faible synthèse ou d'une destruction plus rapide. Le même auteur (84) a mis en évidence le fait que l'AIA est capable de supprimer l'effet morphogène du 2.4.D à condition d'être fourni au tissu en quantité suffisante, à une concentration moléculaire 80 fois plus forte. Il y aurait donc, en un certain sens, antagonisme entre ces deux substances de croissance au niveau des méristèmes.

En résumé, les résultats que nous venons d'examiner laissent tout de même penser que les activités physiologiques du 2.4.D et de l'AIA sont de même nature. Et si certains tissus ne réagissent pas de façon identique à l'un et à l'autre de ces produits, il semble surtout que cela soit dû à une différence de migration et de stabilité de ces composés dans la plante.

II. — ACTIVITÉ BIOCHIMIQUE DE L'AIA ET DU 2.4.D.

Nous allons maintenant chercher à préciser cette idée en étudiant l'action du 2.4.D et de l'AIA sur le métabolisme. Il n'est pas possible, malheureusement, de comparer chaque fois terme à terme ces deux composés, car ce n'est que rarement que les études ont été menées de front avec l'un et l'autre. Nous essayerons de dégager cependant les points communs et les différences marquées.

1^o ACTION SUR LA RESPIRATION CELLULAIRE

L'action stimulatrice du 2.4.D et de l'AIA sur la respiration a été signalée depuis de nombreuses années. D'une manière générale, on peut dire que les faibles doses ont une action favorisante, et les

fortes doses une action inhibitrice. KLINGMAN et AHLGREEN (41) ont signalé cependant bien des contradictions dans un grand nombre d'expériences faites à ce sujet.

Mais certains facteurs peuvent jouer un rôle limitatif et THIMANN (80) a montré que l'AIA n'accélère la respiration cellulaire que si les acides du cycle de KREBS sont présents en assez grande quantité. Si la teneur en acides organiques augmente, par exemple sous l'influence d'une chute de température nocturne, des symptômes analogues à ceux provoqués par un apport extérieur d'AIA ou de 2.4.D apparaissent, par exemple la mise à fleur de l'Ananas, ou la mise à fruit de la Tomate et du Concombre sans pollinisation.

Des précisions importantes ont été apportées grâce à la technique des cultures de tissus *in vitro*. LACHAUX (44) a montré que l'AIA accroissait légèrement la respiration des tissus de Carotte cultivés *in vitro*; NICKELL a étudié le rapport entre la croissance et la respiration des tissus tumoraux en fonction de concentrations croissantes d'hormone : pour l'AIA croissance et respiration maxima sont obtenues pour une même dose mais pour l'ANA et le 2.4.D le maximum de respiration est atteint avant le maximum de croissance (59).

La relation entre ces deux processus a pu être déterminée grâce à l'emploi des inhibiteurs. Le cyanure inhibe simultanément l'un et l'autre. Par contre, la canavanine, à concentration convenable, inhibe seulement l'augmentation de respiration due à l'AIA mais arrête complètement la croissance. De même l'iodoacétate et l'arsenite affectent davantage la croissance que la respiration, ce qui montre, d'après BONNER et BANDURSKI (8) que certaines étapes du mécanisme de l'action de l'AIA sur la croissance sont plus sensibles aux inhibiteurs que les échanges gazeux respiratoires.

Ceci a pu être précisé par l'emploi du 2.4.dinitrophénol qui, inhibant la synthèse de l'ATP, rend inutilisable pour la croissance l'énergie fournie par l'ensemble des oxydations enzymatiques cellulaires. Du désaccouplement ainsi provoqué entre les réactions productrices et réceptrices d'énergie, il s'ensuit que les premières sont accélérées (les échanges gazeux sont activés) tandis que la croissance est bloquée. L'expérience a montré que, dans ces conditions, la croissance induite par l'AIA est inhibée par le DNP sans que le rythme

respiratoire soit accéléré : c'est donc que l'auxine agit au niveau d'un processus sous la dépendance de l'ATP et non directement sur la respiration proprement dite.

2° L'ABSORPTION DE L'EAU

L'absorption d'eau dans les tissus est l'un des processus qui sont intimement liés à l'action du 2.4.D comme à celle de l'AIA.

On sait que le trait commun à la plupart des substances de croissance est de promouvoir l'élongation cellulaire et que celle-ci s'accompagne d'une forte absorption d'eau. Pour BONNER (7) c'est même la seule modification dans la composition chimique de la plante traitée qui soit constante. Certains auteurs ont signalé que l'auxine modifie la structure des parois cellulaires, dans le sens d'une perméabilité accrue ; NEELY (58) a montré que le 2.4.D active la destruction de la protopectine par la pectine méthylestérase. Mais l'absorption d'eau n'est pas seulement due à la modification de la perméabilité cellulaire. C'est un phénomène actif qui exige que la cellule soit vivante, qui est lié à l'intensité de la respiration et qui peut aussi bien se manifester sur le tissu au contact d'une solution plasmolysante ou dans l'eau pure.

HACKETT et THIMANN (37) ont montré que des disques de Pomme de terre, mis au contact d'une solution de 2.4.D., sont le siège d'une absorption d'eau considérable mais que le DNP, en même temps qu'il désaccouple la respiration et la croissance, inhibe également cette absorption.

3° ACTION SUR LES ENZYMES

Un certain nombre d'études ont été entreprises pour rechercher si ces substances avaient une action sur les systèmes enzymatiques soit *in vivo* soit *in vitro*.

A) *Études faites in vivo*. — BERGER et AVERY (3) ont signalé, sous l'influence de l'auxine, une augmentation de 150 à 200 p. 100

de l'activité de la déshydrase alcoolique et de la déshydrase de l'acide malique dans les tissus du coléoptile d'avoine mais pas de variation de l'activité des déshydrases des acides glutamique, citrique ou isocitrique.

GALSTON (31) a montré une chute d'activité catalasique des tissus de Topinambour cultivés avec 2.4.D ou AIA et pense, d'après des études faites sur de nombreux tissus tumoraux ou normaux cultivés *in vitro* que la teneur en catalase est inversement proportionnelle au taux de prolifération cellulaire.

MOREL (55) a trouvé également une chute de l'activité catalasique sous l'influence du 2.4.D dans les cultures de tissus normaux de Topinambour et, toujours sur le même matériel, il a montré que le 2.4.D modifie peu l'activité peroxydasique tandis que l'AIA la stimule.

B) *Études faites sur systèmes enzymatiques isolés.* — Un grand nombre d'enzymes ont été étudiées mais sont peu touchées par le 2.4.D (84). Notons cependant que l'oxydase de l'acide ascorbique des plantules d'Orge et celle de l'acide glycollique voient leurs activités réduites respectivement de 50 p. 100 et de 10 à 20 p. 100 sous l'action du 2.4.D. HAGEN sur Soja (38) et KVAMME (43) sur germe de Blé, ont décelé une inhibition de 50 p. 100 pour cette dernière enzyme.

Mais il faut remarquer, dans toutes ces expériences, les fortes concentrations de 2.4.D nécessaires pour provoquer ces inhibitions : de 10^{-4} M jusqu'à 10^{-2} M en général, alors que les concentrations actives *in vivo* sont de l'ordre de 10^{-6} et même 10^{-7} M. En résumé, jusqu'ici peu de systèmes enzymatiques isolés se sont montrés très sensibles au 2.4.D.

4° ACTION SUR LE MÉTABOLISME DES GLUCIDES

En général, le 2.4.D provoque une diminution rapide de la teneur en amidon et dextrines, accompagnée d'un gain en sucres, puis l'ensemble de la fraction glucidique diminue : c'est-à-dire qu'il y a vraisemblablement hydrolyse des polysides et ensuite dégradation oxydative des oses ainsi libérés.

Cependant ces conclusions ne sont pas valables dans tous les cas. Ainsi WORT (86) rapporte que les tiges de *Polygonum fagopyrum* présentent un enrichissement en sucres totaux, amidon et dextrine dans les 48 heures qui suivent le traitement au 2.4.D. De même, dans le Cotonnier, ERGLE et DUNLAP (22) ont noté une augmentation des teneurs en saccharose, hémicellulose et cellulose tandis que les sucres réducteurs diminuaient.

Dans les tiges de Haricot, SELL (74) trouve bien une diminution des sucres réducteurs et non réducteurs mais WELLER (83), sur les feuilles et la racine de la même plante, note une grande stabilité des sucres et des polyosides, qui contraste avec une chute des sucres non réducteurs.

Travaillant sur des fragments de tige de Pois, CHRISTIANSEN et THIMANN (14) avaient déjà signalé que les auxines favorisaient l'utilisation du saccharose. Par contre, YAKUSHKINA (37) a remarqué qu'une application locale de 2.4.D sur les fleurs de Tomate doublait leur teneur en sucres.

L'utilisation des tissus cultivés *in vitro* a permis d'introduire plus d'unité dans cette question. En effet, COVA (17) et GORIS (35, 35 bis) ont trouvé que des tissus de Carotte cultivés en présence d'AIA sur milieu dépourvu de sucres, perdent rapidement leurs glucides. Si le milieu contient du glucose, du fructose ou du saccharose, les tissus sont le siège d'une accumulation plus ou moins durable de sucres réducteurs (WIGGANS (85)) ou de sucres réducteurs et non réducteurs (GORIS (36)).

En résumé, il semble que si le tissu ou l'organe considéré ne reçoit pas un apport extérieur de glucide, l'augmentation de la respiration entraîne une utilisation plus rapide des réserves ; si, au contraire, les tissus voisins ou le milieu de culture peuvent fournir des hydrates de carbone, il s'établit un nouvel équilibre en fonction du rythme d'approvisionnement et du rythme d'utilisation.

5° INFLUENCE SUR LE MÉTABOLISME DE L'AZOTE

De nombreux auteurs se sont attachés à analyser les modifications produites par le 2.4.D sur la richesse en azote total et la répartition des différentes formes d'azote dans un grand nombre de plantes ou d'organes.

A) *Expériences réalisées sur plantes entières.* — WORT (86) signale, sous l'effet du 2.4.D, une augmentation de la teneur en azote total des tiges et des racines de *Polygonum jagopyrum* avec maximum entre le 4^e et le 8^e jour, tandis que l'azote des feuilles diminue.

Sur le Haricot, WELLER (83) a trouvé que le 2.4.D entraînait un appauvrissement des feuilles et des racines en azote protéique et en certains amino-acides, tandis que pour SELL (74), il y aurait enrichissement de la tige en ces mêmes constituants.

Des travaux importants ont été réalisés par FREIBERG S.R. et CLARK H. E. (27, 28) sur la teneur en différentes formes d'azote des feuilles, de la tige et des racines de Soja. Ces auteurs ont utilisé des Sojas cultivés sur milieu liquide, mis en contact par la racine pendant 24 heures avec une solution de 2.4.D à $4 \cdot 10^{-6}$, puis cultivés de nouveau sur milieu liquide soit avec nitrate, soit sans nitrate ni autre source d'azote. Dans le premier de leurs travaux (27), ils ont noté que le 2.4.D ralentissait l'absorption des nitrates et surtout qu'il modifiait la répartition des différentes formes d'azote. Par rapport au témoin, les protéines de la feuille diminuaient, celles de la tige et de la racine augmentaient tandis que, dans les deux cas, l'azote aminé soluble et surtout l'azote résiduel augmentaient considérablement. Les auteurs ont ensuite (28) essayé de confirmer ces résultats par l'étude de la Protéinase et de la Peptidase mais leurs résultats furent assez surprenants : par rapport au témoin, l'activité de ces enzymes était diminuée dans les feuilles et augmentée dans les tiges et la racine, alors qu'on attendait l'inverse.

B) *Sur organe ou fragment d'organe.* — Le comportement de fragments de tige de Pois, mis à flotter sur des solutions d'auxine, a été étudié par CHRISTIANSEN et THIMANN (14).

Ces auteurs ont signalé que l'AIA provoquait une utilisation accrue des acides organiques, une sensible diminution de la teneur en acides aminés libres et une faible, mais réelle, synthèse de protéines. Cette concordance entre croissance et protéosynthèse est à leurs yeux d'une grande signification.

Par contre, BOROUGHS (9), dans une étude réalisée à l'aide de sections de coléoptiles de Maïs, ne trouve rien de semblable. Il met ces fragments en présence de solutions nutritives contenant de la glycine ou de la leucine marquées au ^{14}C et considère à la fois la teneur en azote protéique et le taux d'accumulation de la radioactivité dans les protéines. Dans ces conditions, le 2.4.D n'augmente ni la radioactivité spécifique des protéines, ni la teneur en azote protéique.

De même BURSTRÖM (12), étudiant la croissance de la racine de Blé, note qu'une anti-auxine comme l'acide parachlorophénoxyisobutyrique n'entraîne qu'une augmentation de 8 p. 100 de la teneur en N protéique pour un accroissement de la racine en longueur de 88 p. 100, ce qui signifie pour lui l'absence de liaison intime entre la croissance et la synthèse des protéines.

C) *Action du 2.4.D sur la teneur du grain de Blé en protéines.* — Plusieurs auteurs ont signalé que les Blés désherbés au 2.4.D produisaient une farine plus riche en protéine. HELGESON et ses collaborateurs (39) ont trouvé cette augmentation dans les blés tendres traités par un ester du 2.4.D, tandis que les sels d'ammonium et de sodium auraient un effet contraire sur les blés durs.

ERICKSON et ses collaborateurs (23) ont rapporté des expériences faites en 1946 et 1947 sur sept variétés de Blés d'hiver. Les résultats de 58 analyses de Blé, provenant de cultures sur terrain sec ou irrigué, sont les suivants :

DOSE DE 2.4.D. EN kg/ha	TENEUR DU GRAIN EN PROTÉINES
0	10,9 %
0,67	11,6 %
1,57	12,7 %
2,24	13,8 %
5,15	15,5 %

Plus la dose de 2.4.D augmente, plus la farine est riche en protéines. Il serait évidemment intéressant de pouvoir comparer à ces chiffres le rendement total à l'hectare, qui, lui, doit baisser en fonction de la dose de 2.4.D.

Il est donc probable qu'ici le gain en azote n'est que relatif et correspond à une modification de la répartition de l'azote dans la plante plus qu'à une croissance globale nette rapportée à l'hectare de culture.

D) *Étude des protéines de la Pomme de terre.* — PAYNE et ses collaborateurs, après avoir signalé que le 2.4.D provoquait une augmentation des protéines du tubercule de Pomme de terre, ont analysé, par électrophorèse sur papier, les protéines des tubercules provenant de pieds traités et de pieds témoins (66). Leurs résultats mentionnent que l'enrichissement en protéines, sensibles dès la dose de 0,5 kg/ha, s'accompagne d'une modification profonde de la nature de ces protéines, surtout dans les jours qui suivent la récolte. (Voir aussi (88).)

Première partie

TECHNIQUES

CULTURE DES TISSUS *IN VITRO*

Lorsqu'on met en culture *in vitro* une tranche de Carotte sur un milieu gelosé de composition convenable, on assiste dès la deuxième semaine de l'expérience à la naissance d'un bourrelet parenchymateux au niveau du Cambium. Ce bourrelet continue par la suite à proliférer activement en même temps que le Xylème, tandis que le Phloème se couvre seulement de quelques mamelons isolés. Au bout de 6 semaines, un cal volumineux et généralement inégal recouvre le Xylème et l'Assise génératrice de l'explantat primitif.

On prélève alors sur ce cal la zone qui a manifesté la croissance la plus vigoureuse et on la repique sur un milieu de culture neuf : après plusieurs semaines de culture on obtient de nouveau une colonie compacte constituée par un tissu ferme de nature parenchymateuse. Par repiquages successifs on constitue ainsi une Souche de tissus *in vitro*.

GAUTHERET (33) a montré combien la présence d'une auxine dans le milieu de culture (AIA, acide naphthalène acétique ou 2.4.D) stimulait la prolifération des explantats primitifs. Des concentrations de 10^{-5} à 10^{-7} g/cm³ sont à ce moment nécessaires pour obtenir une croissance optimum, mais au cours des repiquages suivants, on constate que de faibles doses, 10^{-7} à 10^{-8} g/cm³ sont suffisantes tandis que les plus fortes deviennent toxiques. Après un grand nombre de passages sur des milieux renfermant une auxine, la souche peut, dans certains cas, acquérir la faculté de se développer sans auxine, comme le ferait un tissu tumoral. GAUTHERET a donné, à ce phénomène particulier d'accoutumance à l'auxine, le nom d'anergie.

Les tissus anergiés ont perdu la sensibilité aux effets excitomorphateurs des auxines mais présentent semble-t-il une plus grande réactivité à leur action toxique. C'est la raison pour laquelle nous avons utilisé la souche de tissus de l'arotte anergiée de cet auteur (32).

Dans nos expériences les fragments de colonies tissulaires pèsent 300 à 400 milligrammes lors du repiquage et atteignent en moyenne un poids frais de 2.500 milligrammes 6 semaines plus tard, en fin de culture.

La teneur en matière sèche de ces tissus est de 8 à 8,5 p. 100 pour des colonies âgées de 6 à 8 semaines, mais elle descend jusqu'à 6,80 et même 6,67 p. 100 pour des cultures de 80 jours (cf. tabl. XI). Dans nos conditions de travail nous n'avons pu mettre en évidence des variations sensibles de cette teneur en matière sèche sous l'influence des différentes doses d'auxine; en conséquence, nous avons exprimé tous nos résultats de dosage par rapport au poids frais des tissus.

MILIEUX DE CULTURE

1° *Milieu de base.* — Le milieu mis au point par GAUTHERET au cours de ses recherches sur la culture des tissus végétaux contient, pour un litre d'eau bidistillée :

$(\text{NO}_3)_2 \text{Ca}, 4\text{H}_2\text{O}$	0,500	g
NO_3K	0,125	g
$\text{SO}_4\text{Mg}, 7\text{H}_2\text{O}$	0,125	g
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0,125	g
Glucose	30	g
Vitamine B_1	0,001	g
Solution de Berthelot modifiée (1).	10	gouttes
Gélose	12	g
(1) Eau bidistillée	1 000	ml
Sulfate ferrique $(\text{SO}_4)_3 \text{Fe}_2, 9\text{H}_2\text{O}$	50	g
Sulfate de manganèse $\text{SO}_4\text{Mn}, 7\text{H}_2\text{O}$	2	g
Iodure de potassium IK	0,5	g
Chlorure de nickel $\text{Cl}_2\text{Ni}, 6\text{H}_2\text{O}$	0,05	g
Chlorure de cobalt $\text{Cl}_2\text{Co}, 6\text{H}_2\text{O}$	0,05	g
Sulfate de titane $5\text{TiO}_2, \text{SO}_3, 5\text{H}_2\text{O}$	0,20	g
Sulfate de zinc $\text{SO}_4\text{Zn}, 7\text{H}_2\text{O}$	0,10	g
Sulfate de cuivre $\text{SO}_4\text{Cu}, 5\text{H}_2\text{O}$	0,05	g
Sulfate de glucinium $\text{SO}_4\text{Be}, 4\text{H}_2\text{O}$	0,10	g
Acide borique BO_3H_3	0,05	g
Acide sulfurique 66° Bé	1	ml

2° *Milieux sans nitrate.* — Pour des expériences de transplantation de souche de courte durée, n'excédant pas 15 jours, les nitrates ont été supprimés du milieu de culture.

L'azote nitrique a été remplacé suivant le cas par une solution de :

glycine	8 mM	soit	600 mg/l
acide glutamique.	8 mM	—	1 177 mg/l
arginine.	4 mM	—	696 mg/l

Le potassium et le calcium ont été fournis sous forme de chlorure, la composition en sels minéraux devenant alors la suivante :

Cl ₂ Ca, 2H ₂ O.	0,500 g
SO ₄ Mg, 7H ₂ O.	0,125 g
ClK	0,125 g
PO ₄ H ₂ K	0,125 g

Dans certaines expériences le potassium et le calcium ont été supprimés. Il a été vérifié que, pour des expériences brèves, ceci n'avait pas d'importance appréciable.

Les milieux sans nitrate contenant des acides aminés sont des milieux liquides. S'ils doivent comporter en outre une dose traceuse d'un acide aminé marqué au ¹⁴C, celui-ci est ajouté juste avant la stérilisation par autoclavage.

RÉCIPIENTS DE CULTURE

Pour les milieux liquides radioactifs, la solution adoptée a été de cultiver des fragments de tissu par groupes de quatre ou cinq dans des fioles d'Erlenmeyer de 300 millilitres dont le bouchon rodé se prolonge, à sa partie inférieure, par une nacelle destinée à recevoir une solution de soude concentrée et, à sa partie supérieure, par une tubulure horizontale. Cette tubulure est reliée à un absorbeur également rempli de solution concentrée de soude. De cette manière le ¹⁴CO₂ provenant de la respiration des tissus est piégé dans l'absorbeur interne et ne peut s'échapper à l'extérieur. De l'extérieur vers l'intérieur, le CO₂ est piégé dans l'absorbeur externe, mais l'oxygène peut passer, de sorte que la tension d'oxygène reste constante pendant toute l'expérience à l'intérieur de la fiole d'Erlenmeyer.

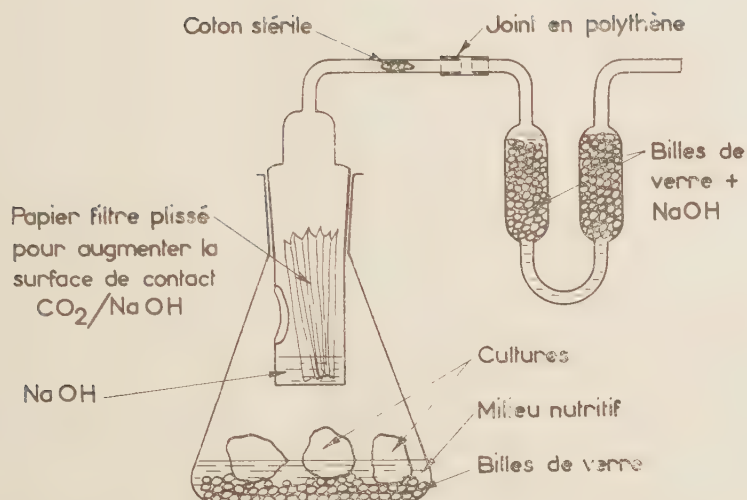


FIG. 1. — Au fond de la fiole, on dispose un lit de billes de verre, qui servent de support aux cultures.

Dans ces conditions, un volume de milieu de 50 millilitres est suffisant pour assurer la demi-immersion des cultures.

TECHNIQUES CHIMIQUES

A. — TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE DOSAGE

CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVE DES ACIDES AMINÉS SUR PAPIER

Le dosage des acides aminés constitue l'élément le plus important de notre travail et c'est pourquoi une étude assez longue y a été consacrée.

La méthode recherchée devait à la fois être sûre, reproductible, et se prêter aux dosages en série. Avant de décrire en détail la technique adoptée, il a semblé utile de passer brièvement en revue celles qui sont actuellement proposées.

I. — LES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE DOSAGES DES ACIDES AMINÉS

1^o Dosages microbiologiques

La connaissance exacte des besoins nutritifs de certains micro-organismes et le perfectionnement des milieux de culture synthétique ont permis de mettre au point des méthodes de détermination quantitative de nombreux constituants de ces milieux.

Le principe du dosage est le suivant : certains constituants du milieu, dits essentiels, sont indispensables à la croissance du micro-organisme et cette dernière est fonction de leur concentration. Il s'ensuit que si l'on soustrait complètement ce constituant du milieu et si on le remplace par une quantité inconnue du même produit, la mesure de la croissance du champignon ou de la bactérie par turbidimétrie ou acidimétrie donne la valeur de cette inconnue.

Le point le plus important est que le constituant, ici l'acide aminé, soit véritablement essentiel pour le micro-organisme utilisé et que d'autres facteurs n'interviennent pas pour atténuer la carence recherchée. C'est ainsi que la présence ou l'absence de vitamine B⁶, d'oxygène ou de gaz carbonique, peuvent influencer sur le caractère essentiel de cet acide aminé. De même, quand on utilise les mutants du *Neurospora crassa*, il faut être sûr qu'il n'y a pas de retour au type d'origine qui, lui, est insensible à la présence de l'acide aminé étudié.

Cette méthode, introduite par OSBORNE et MENDEL (62) en 1914, a subi un renouveau d'intérêt depuis 1943. De nombreux auteurs, LYMAN et KUIKEN (48), GALE (30) ont mis au point des techniques comparables dans bien des cas aux méthodes physico-chimiques récentes. STOKES et GUNNESS (78) estiment que la précision est la même que pour le dosage microbiologique des vitamines, c'est-à-dire ± 15 p. 100 ; la marge d'erreur peut toutefois être considérablement réduite si les essais sont répétés un grand nombre de fois.

Il n'en reste pas moins que ces méthodes biologiques sont longues et délicates.

2° Colorimétrie après chromatographie sur colonne

a) SÉPARATION DES ACIDES AMINÉS EN QUATRE GROUPES ET RÉACTIONS COLORÉES SPÉCIFIQUES. — Le schéma de la séparation en 4 groupes est le suivant :

monoacides diaminés	adsorbés sur gel de silice
diacides monoaminés	adsorbés sur alumine acide
acides aminés aromatiques	adsorbés sur charbon actif
monoacides monoaminés neutres	restent dans le filtrat final.

Dans chaque fraction il faut alors rechercher les acides aminés présents, au moyen d'une réaction spécifique à la touche sur papier par exemple, puis les doser par une méthode spécifique le plus souvent colorimétrique.

Cette méthode est bonne, quoique lente : il faut, pour chaque extrait à analyser, réaliser trois passages sur colonne et mettre en œuvre autant de techniques colorimétriques distinctes qu'il y a d'acides aminés. La colorimétrie finale est d'une précision variable :

± 3 p. 100 pour la tyrosine, ± 5 p. 100 pour hydroxyproline, ornithine, lysine.

Comme les méthodes microbiologiques, elle a le tort de ne pas être exhaustive, car il n'est jamais certain que tous les acides aient été mis en évidence.

b) SÉPARATION COMPLÈTE DES ACIDES AMINÉS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE, PUIS DOSAGE COLORIMÉTRIQUE. — PETERSON et REINEKE (67) ont décrit un fractionnement sur colonne de poudre de cellulose et STEIN et MOORE sur colonne d'amidon, mais la séparation sur résine échangeuse de cations semble la meilleure.

La technique de MOORE et STEIN (54), très précise, consiste à faire passer les acides aminés sur une colonne de Dowex 50, haute d'un mètre et à éluer par des solutions tampons de pH croissant. Les fractions successives sont recueillies au moyen d'un collecteur automatique. Dans chacun des 200 ou 300 tubes on fait une réaction à la ninhydrine et on termine par une lecture au colorimètre.

On obtient finalement, point par point, une courbe d'élution dont chaque pic correspond à un acide aminé. Si le passage sur colonne est fait soigneusement, dans les conditions décrites par les auteurs (température, vitesse d'écoulement), les différents acides sont élués quantitativement dans un ordre constant.

Cette méthode sûre et reproductible, très sensible, est en même temps précise (± 2 %). Mais le fractionnement sur colonne, suivi de la réaction colorée à faire sur plusieurs centaines de tubes, sont des opérations longues et minutieuses.

Il nous a semblé que nous aurions avantage, pour un travail de physiologie exigeant l'analyse d'un nombre relativement élevé d'extraits, à rechercher une méthode plus facile à mettre en œuvre, mais donnant cependant une précision suffisante.

3^o Chromatographie quantitative sur papier

Lorsque CONSDEN, GORDON et MARTIN (16) mirent au point en 1944 leur technique de chromatographie des amino-acides sur papier, la méthode de MOORE et STEIN n'était pas encore connue et

la détermination de la composition des protéines alimentaires par exemple, par voie microbiologique, exigeait de longs et patients travaux. La nouvelle technique permettait de séparer et d'identifier tous les acides aminés d'un extrait beaucoup plus rapidement et sûrement que toutes celles connues alors : elle prit de ce fait un essor rapide.

Il n'est pas nécessaire de rappeler ici les étapes principales du développement de la chromatographie sur papier mais il faut remarquer que son application au domaine de l'analyse quantitative n'a pas été de loin aussi importante que son extension rapide au domaine qualitatif : excellente méthode qualitative, elle est généralement considérée comme fournissant au mieux un renseignement d'ordre semi-quantitatif.

En ce qui concerne les acides aminés, il faut bien reconnaître que l'abondance et la diversité des techniques quantitatives proposées laissent à penser qu'aucune n'est vraiment satisfaisante. Elles sont presque toutes basées sur l'emploi de la ninhydrine qui donne, avec la plupart des amino-acides, une coloration bleue violacée et avec quelques autres une couleur jaune ou brune.

Nous allons maintenant décrire brièvement le principe des techniques habituellement proposées.

a) MÉTHODE DE LA SURFACE DES TACHES. — FISHER 1948-1949 (25).

Pour des chromatogrammes issus de taches initiales de même diamètre, la surface est proportionnelle au logarithme de la concentration.

La méthode consiste donc, après révélation des taches, à en mesurer la surface à l'aide d'un planimètre. Si elles ont des contours nets et si on opère avec six à dix répétitions pour l'essai et le témoin, on peut espérer une précision de 5 à 10 p. 100.

Elle ne s'applique pas aux chromatogrammes bidimensionnels.

b) COLORATION TOTALE D'APRÈS BLOCK, 1948 (4) et BULL, 1949 (11). — Le chromatogramme à une dimension est passé, après révélation de taches, devant la cellule d'un densitomètre à enregistrement automatique. On obtient une courbe donnant la densité

optique en fonction de la distance par rapport à l'origine. Chaque acide révélé se traduit par un pic sur la courbe. L'aire comprise sous la courbe est proportionnelle à la concentration de l'acide.

BLOCK (4) utilise une série de six chromatogrammes avec des solvants différents. La tyrosine et l'histidine sont révélées par la sulfanilamide diazotée sur l'un des chromatogrammes, la proline et l'hydroxyproline par l'isatine sur un deuxième, sur un troisième la méthionine est révélée par l'iodure de platine dans l'acétone et enfin sur les trois derniers on fait réagir la ninhydrine pendant 18 à 28 heures à température ambiante.

REDFIELD et BARRON (71) utilisent également six solvants à base d'Éthanol, Méthanol, Butanol, Lutidine, Diméthylamine, révèlent à la ninhydrine ou à l'isatine (cette dernière pour la proline) et passent le chromatogramme au densitomètre. La précision pour une seule détermination serait de $\pm 4,36$ p. 100. Ce résultat est assez surprenant si l'on se reporte aux courbes publiées par les auteurs, car les pics correspondant à chaque acide sont assez mal isolés et un calcul d'approximation doit être fait pour évaluer la surface qui appartient à chacun des constituants.

c) MÉTHODE DE LA DENSITÉ OPTIQUE MAXIMUM. — Une simplification de la méthode précédente consiste à ne mesurer que la densité optique maximum au centre de la tache colorée, en admettant que cette grandeur est proportionnelle à la concentration de l'acide aminé. Dans ce cas, l'emploi d'un système d'enregistrement automatique de la densité optique n'est pas nécessaire.

La précision du dosage en soufre et BLOCK (4) indique qu'elle est de l'ordre de ± 10 p. 100 sur dix-huit répétitions.

d) ÉLUTION SUIVIE D'UNE COLORIMÉTRIE. — Cette méthode a été largement utilisée et présente de nombreuses variantes.

Pour BOISSONNAS (6) et FOWDEN (26) les taches, repérées soit par une première et incomplète révélation à la ninhydrine, soit par fluorescence en U.V., sont ensuite éluées et la réaction quantitative à la ninhydrine est réalisée sur cet éluat.

MARTIN en 1948, AWAPARA en 1949 (2) ont décrit des méthodes quantitatives utilisant la réaction au phosphate de cuivre de POPE et STEVENS (58).

Pour THOMPSON, ZACHARIUS et STEWARD (81, 82) la révélation faite sur le papier dans des conditions soigneusement standardisées est unique et complète et la colorimétrie est ensuite réalisée sur l'éluat des taches.

Cette dernière technique présente un certain nombre d'avantages qui nous l'ont fait adopter et nous nous proposons de l'étudier plus longuement.

Technique de Thompson, Zacharius et Steward (81)

Ces auteurs ont entrepris tout d'abord de déterminer les facteurs qui intervenaient dans la réaction de la ninhydrine avec les amino-acides, sur le papier, indépendamment du problème de la séparation chromatographique, puis ils ont étudié les éléments qui conditionnent l'obtention de chromatogrammes reproductibles.

1° LES FACTEURS QUI INTERVIENNENT DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA RÉACTION COLORÉE. — On emploie habituellement la ninhydrine en solution dans l'éthanol ou le butanol saturés d'eau : on en pulvérise quelques dizaines de millilitres sur le chromatogramme que l'on sèche ensuite dans une étuve ou un four. On constate dans ces conditions que, toutes choses égales par ailleurs, et pour une même concentration en acide aminé, l'intensité de la coloration varie dans de larges proportions d'une fois à l'autre.

C'est que l'emploi du papier comme support d'une réaction colorée se heurte à de nombreuses difficultés :

— la réaction colorée se faisant souvent, comme ici, à chaud, il faut s'assurer que la température et la durée du chauffage sont suffisantes pour obtenir la densité optique maximum mais en même temps veiller à ce que la coloration, une fois formée, ne soit pas immédiatement détruite, ce qui risque fort de se produire dès que le solvant du réactif s'est évaporé ;

— la difficulté est aggravée si l'on désire doser simultanément plusieurs composés différents, car il n'est pas certain que les conditions optimales de révélation soient les mêmes pour chacun ;

— enfin, le réactif coloré doit être réparti uniformément sur le

papier et en quantité suffisante. Ce dernier point serait très difficile à réaliser si l'on n'utilisait un large excès de réactif.

Au cours de leur étude, les auteurs de la méthode ont étudié les points suivants :

α) Importance de la saturation en alcool de l'enceinte de révélation. — A température et temps de chauffage égaux, la densité optique de l'éluat des taches est fonction de la saturation en éthanol de l'enceinte de révélation, c'est-à-dire fonction du temps d'évaporation du solvant qui imbibe le papier :

— pour les acides aminés du type alanine, cette densité optique diminue quand la saturation augmente, donc quand le papier sèche vite ;

— pour ceux du type sérine, cette densité optique passe par un maximum puis décroît.

Il paraît donc impossible, à ce point de l'étude, de bien doser en même temps les deux types d'acides aminés.

β) Destruction de la coloration au cours d'un chauffage prolongé en étuve de révélation. — En atmosphère saturée d'alcool et à 60° C, la densité optique commence par augmenter, rapidement pour l'alanine, lentement pour la sérine, mais après 20 minutes elle diminue pour tous les acides aminés étudiés.

Il semble donc, d'après ces premiers éléments, que la vitesse de formation et de dégradation du complexe coloré soit différente pour chaque acide aminé, ce qui rend leur dosage simultané délicat, à moins de trouver le moyen par exemple de stabiliser la solution colorée.

γ) Révélation en l'absence d'oxygène. — THOMPSON et ses collaborateurs ont mis en évidence l'influence néfaste de l'oxygène sur la stabilité du produit de la réaction ; par contre, si la révélation est faite en l'absence d'oxygène, quelle que soit la rapidité d'obtention de la coloration maximum et pourvu que le papier reste imbibé de solvant, une fois obtenue, elle reste stable.

Pour obtenir des résultats reproductibles, il convient donc d'opérer en atmosphère de CO₂ ou d'azote.

Compte tenu de leurs expériences, les auteurs adoptèrent alors les conditions opératoires suivantes :

- la réaction est faite en atmosphère saturée d'alcool ;
- la réaction est faite en atmosphère de gaz carbonique ;
- le temps de chauffage est de 30 minutes, à 60° C ;
- à la sortie du four, le papier est séché à l'air libre, car la présence d'oxygène ne gêne plus à ce stade.

2° LES FACTEURS PRINCIPAUX QUI INTERVIENNENT DANS LA CHROMATOGRAPHIE.

α) Existence des pertes. — Si l'on essaie de récupérer l'acide aminé d'une tache chromatographique, on constate qu'il y a toujours une perte par rapport à la quantité déposée initialement sur le papier, et cette perte est d'autant plus importante que la migration sur le chromatogramme a été plus longue. Ceci est vrai pour tous les acides aminés et surtout pour les acides hydroxyaminés comme la sérine et la thréonine.

β) Leurs causes. Remèdes proposés. — Les pertes ainsi constatées peuvent provenir soit d'une réaction entre l'acide aminé et le solvant ou l'atmosphère de la chambre à chromatographie, soit d'une rétention par le papier au cours du cheminement.

L'expérience montre effectivement que (82) le phénol en présence d'air, ou mieux les produits d'oxydation du phénol provoquent une désamination oxydative des acides aminés. Le remède serait d'opérer en atmosphère d'azote mais les complications d'appareillage qui en résulteraient seraient trop considérables par rapport à l'amélioration obtenue.

De toute manière, ces pertes sont de beaucoup inférieures à celles dues à l'adsorption sur la cellulose, qui peuvent atteindre 0,4 à 2 p. 100 par centimètre de cheminement, soit pour 20 centimètres de cheminement de 8 à 40 p. 100 de perte totale. Il y a donc là un point important à préciser : ou bien on réduit au maximum les pertes par rétention de manière à les rendre négligeables ou bien on standardise les conditions de travail pour avoir des pertes reproductibles.

γ) *Essai de diminution des pertes par adsorption.* — L'expérience montre que sur une feuille de papier Whatman n° 1, lavée à l'eau distillée, les mélanges solvants (butanol-acide acétique ou phénol-crésol) cheminent beaucoup plus vite et que les pertes en acides aminés sont considérablement réduites. Un simple lavage à l'eau a pu en effet débarrasser le papier d'une bonne partie des impuretés et charges qu'il contenait et qui s'opposaient à la progression des solvants. Il faut admettre par ailleurs que ces impuretés contribuaient à augmenter l'intensité des phénomènes d'adsorption puisque leur disparition entraîne une baisse de celle-ci.

On peut encore diminuer les pertes par adsorption en lavant le papier à l'acide ClH 0,3 N puis en le neutralisant par NaOH 0,5 N et en le rinçant abondamment à l'eau distillée.

Cependant, même dans ce dernier cas, les pertes par adsorption, quoique réduites, ne sont pas totalement supprimées.

Il faut noter, en outre, que le lavage des feuilles est une opération délicate, longue et que, finalement, on n'est pas assuré d'obtenir des feuilles dont le rapport de la perte en acide à la distance parcourue soit rigoureusement constant.

II. — ÉTUDE DE LA COLORIMÉTRIE SUR PAPIER DES ACIDES AMINÉS

De même que les auteurs, nous avons étudié successivement les deux phases de la méthode et avons essayé en premier lieu d'établir des courbes étalons pour le dosage sur papier des acides aminés.

Dans tous les cas, la solution de ninhydrine employée est la même que celle de THOMPSON et STEWARD, soit 2 p. 100 de ninhydrine dans de l'éthanol contenant 2 p. 100 d'un mélange collidine : lutidine (1 : 3) qui a pour effet de tamponner le milieu de la réaction.

1° MATÉRIEL UTILISÉ. — *Papier* Whatman n° 1.

Micropipette pour déposer les taches d'amino-acides sur le papier support de la réaction.

C'est une micropipette de 100 millimètres cubes graduée en

millimètre cube. La pointe a été effilée de manière à empêcher la colonne de liquide pipetée de s'écouler librement. On peut ainsi déposer facilement sur le papier de 5 à 50 millimètres cubes de solution, par fractions de 2 ou 3 millimètres cubes, ce qui permet d'obtenir des taches de faible diamètre (5 mm). Entre chaque appli-

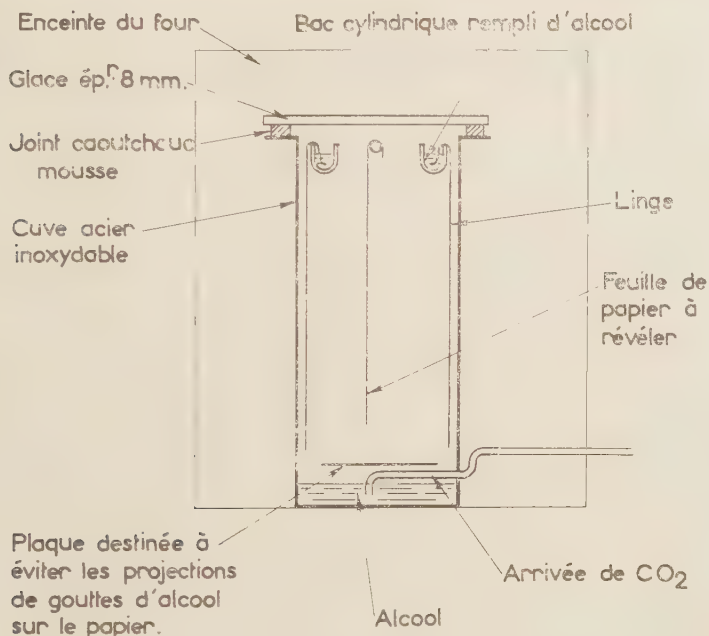


FIG. 2. — Cuve à révéler les chromatogrammes.

cation on fait arriver sur la tache un courant d'air chaud pour accélérer l'évaporation du liquide.

Cuve à révélation. — (Figure 2).

C'est une cuve parallélépipédique en acier inoxydable ouverte à sa partie supérieure, munie à sa partie inférieure d'un ajutage latéral pour l'arrivée du CO₂. Les deux parois longitudinales sont recouvertes intérieurement d'un linge plongeant par son extrémité supérieure dans un bac cylindrique plein d'alcool, afin d'assurer la saturation de l'atmosphère en vapeurs d'alcool.

La partie supérieure de la cuve est obturée par une glace de 8 mm d'épaisseur reposant sur un joint en caoutchouc mousse.

La feuille de papier Whatman support de la réaction est suspendue au milieu de la cuve.

Dès qu'elle est en place, on met la cuve à révélation dans le four à température constante.

2° LE MODE OPÉRATOIRE comprend les opérations suivantes :

1° *Dépôt des taches.* — Une petite capsule de verre est placée à l'endroit voulu, sous la feuille de papier. A l'aide d'une micropipette, comme il a été indiqué précédemment, on dépose un volume connu de solution par fractions de 3 μ l, séchées immédiatement au moyen d'un séchoir à air chaud.

La feuille de papier mesure 25 $\times$ 35 cm. Parallèlement au grand côté, les taches sont déposées sur deux lignes distantes de 8 cm. L'intervalle entre taches d'une même ligne est de 3 cm.

2° *Pulvérisation de la solution de ninhydrine.* — A l'aide d'un pulvérisateur branché sur une pompe à membrane on pulvérise environ 10 ml du réactif sur chaque feuille, en prenant soin de ne pas faire ruisseler le réactif en excès, ce qui aurait pour conséquence, lors de la révélation, de former des auréoles autour des taches colorées.

3° Avant que le réactif ait le temps de sécher, on plonge le papier dans la cuve et on place aussitôt celle-ci dans le four dont la température a été préalablement réglée à 60°. On branche alors rapidement le tuyau de gaz carbonique sur la cuve.

4° Au bout de 30 minutes, on sort le papier. Si l'atmosphère de la cuve est restée saturée en alcool, la zone préalablement pulvérisée doit être encore humide. On fait sécher le papier à l'étuve à 25° $\pm$ 1° pendant trois heures.

5° On découpe alors les taches colorées en même temps qu'une bande témoin. On les pèse, ceci pour avoir une grandeur proportionnelle à leur surface et on les place, par ordre, dans des flacons de verre de 25 ml.

6° On verse dans chaque flacon 10 ml d'alcool à 95° dilué au 1/2. On agite de temps en temps pour mieux dissoudre le complexe coloré.

7° Au bout de 30 minutes, on fait la lecture au photocolorimètre à 570 m μ .

6° A chaque tache correspond donc une valeur D_t de la densité optique. Il faut lui retrancher la valeur D_p correspondant à la coloration propre du papier. D_p est proportionnelle à la surface de la tache, donc au poids, si l'on néglige pour ce terme correctif les variations d'épaisseur du papier, et il est calculé à partir de la densité optique de la bande témoin. On obtient ainsi la valeur corrigée $D = D_t - D_p$.

3° ÉVOLUTION DE LA COLORATION EN FONCTION DU TEMPS. —

Bien que nous appliquions aussi scrupuleusement que possible le mode opératoire précédent, nous avons constaté des anomalies importantes dans les résultats. Fréquemment chaque essai, fait en double, donnait deux courbes au lieu d'une seule. Cet essai fut recommencé trois fois pour l'alanine. Les résultats donnaient toujours deux courbes.

Deux hypothèses pouvaient être faites :

1° Chaque courbe correspondait à une série de taches disposées à même hauteur du fond de la cuve de révélation. Or, la série de taches la plus profonde donnait des densités optiques plus fortes. Dans ce cas, l'intensité de la coloration pouvait être fonction de la position de la tache dans la cuve de révélation.

2° Mais chaque série de taches n'était pas découpée et éluee en même temps. La série de taches profondes était toujours éluee en dernier, 2 ou 3 heures après l'autre. Dans ce cas, on pouvait supposer que la coloration s'intensifiait avec le temps.

L'expérience a confirmé cette deuxième hypothèse. Nous avons, en effet, disposé deux séries de taches de 20 millimètres cubes d'Alanine 0,01 M sur une feuille de papier suivant la même disposition que précédemment (une série à 8 cm du bord inférieur de la feuille, l'autre 8 cm au-dessus de la 1^{re}). Après révélation, nous avons élué immédiatement la moitié de chaque série : les colorations des taches de la demi-série inférieure et de la demi-série supérieure étaient à peu près les mêmes. Trois heures plus tard, nous avons élué les demi-séries restantes et avons constaté que les colorations étaient comparables entre elles mais nettement supérieures aux précédentes, ainsi que le montre le tableau II.

C'est donc la preuve que la coloration s'intensifie avec le temps.

TABLEAU II

VALEURS DE LA DENSITÉ OPTIQUE CORRIGÉE POUR DES TACHES DE 20 MM² D'ALANINE 0,01 M RÉVÉLÉES À 60° PENDANT 30 MIN. SOLUTION DE NINHYDRINE À 2 % DANS L'ÉTHANOL 95° À 2 % DE COLLIDINE-LUTIDINE (1/3)

DENSITÉ OPTIQUE	EXTRACTION IMMÉDIATE	EXTRACTION APRÈS 3 H
Haut du papier	0,1690 0,1685	0,2308 0,2303
Bas du papier.	0,1568 0,1541	0,2315 0,2295

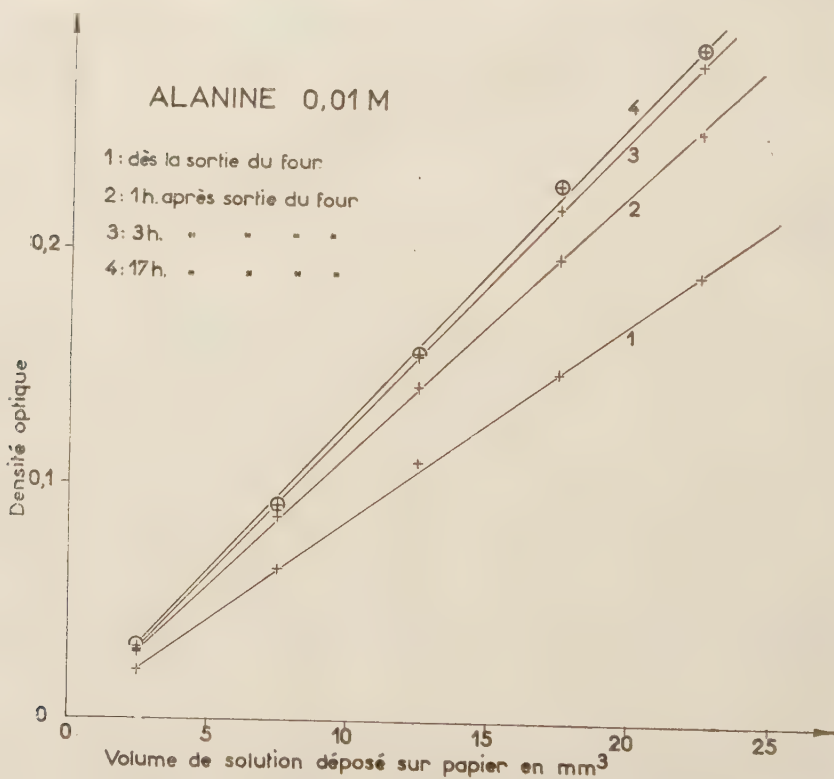


FIG. 3. — Évolution de l'intensité de la coloration d'une tache d'Alanine en fonction du temps écoulé après la sortie du four de révélation.

L'évolution de la coloration est nulle après 3 heures. C'est ce que montrent des courbes témoins réalisées (fig. 3) :

- 1° dès la sortie du four;
- 2° 1 heure après la sortie du four;
- 3° 3 heures après la sortie du four;
- 4° 17 heures après la sortie du four.

Cette évolution de la coloration n'a pas été remarquée par les auteurs, bien qu'elle soit importante. Toutes les courbes établies par la suite l'ont été en tenant compte de ce fait. Lorsqu'un papier sort du four, il est placé aussitôt dans une étuve à 25° pendant au moins 3 heures. Il est important que cette étuve soit obscure car la lumière fait virer la teinte de fond du papier du blanc au beau pâle, ce qui nuit à la précision du dosage.

4° RÉSULTATS. — Des courbes témoins ont été réalisées pour plus de quinze acides aminés. Deux groupes d'acides peuvent être distingués, d'après l'intensité de la coloration qu'ils donnent, à des concentrations équimolaires (fig. 4 à 7).

COLORATION INTENSE

Sérine
Glycine
Thréonine
Alanine
Ac. γ -amino-butérique
Valine
Leucine
Citrulline
Lysine
Histidine
Ornithine
Acide glutamique

COLORATION FAIBLE

Phénylalanine
Tyrosine
Tryptophane
Arginine
Acide aspartique

Enfin l'asparagine, la proline et l'hydroxyproline, qui donnent des colorations jaune ou brun faible, ne se prêtent pas au dosage colorimétrique par cette méthode.

Quelques-unes de ces courbes sont reproduites ci-après. Leur examen montre sans ambiguïté que la méthode employée est satisfaisante.

5° PRÉCISION DE LA MÉTHODE. — a) *Prise d'essai*. — La pipette utilisée est graduée en μ l. On peut évaluer l'erreur systématique de

DOSAGE SUR PAPIER

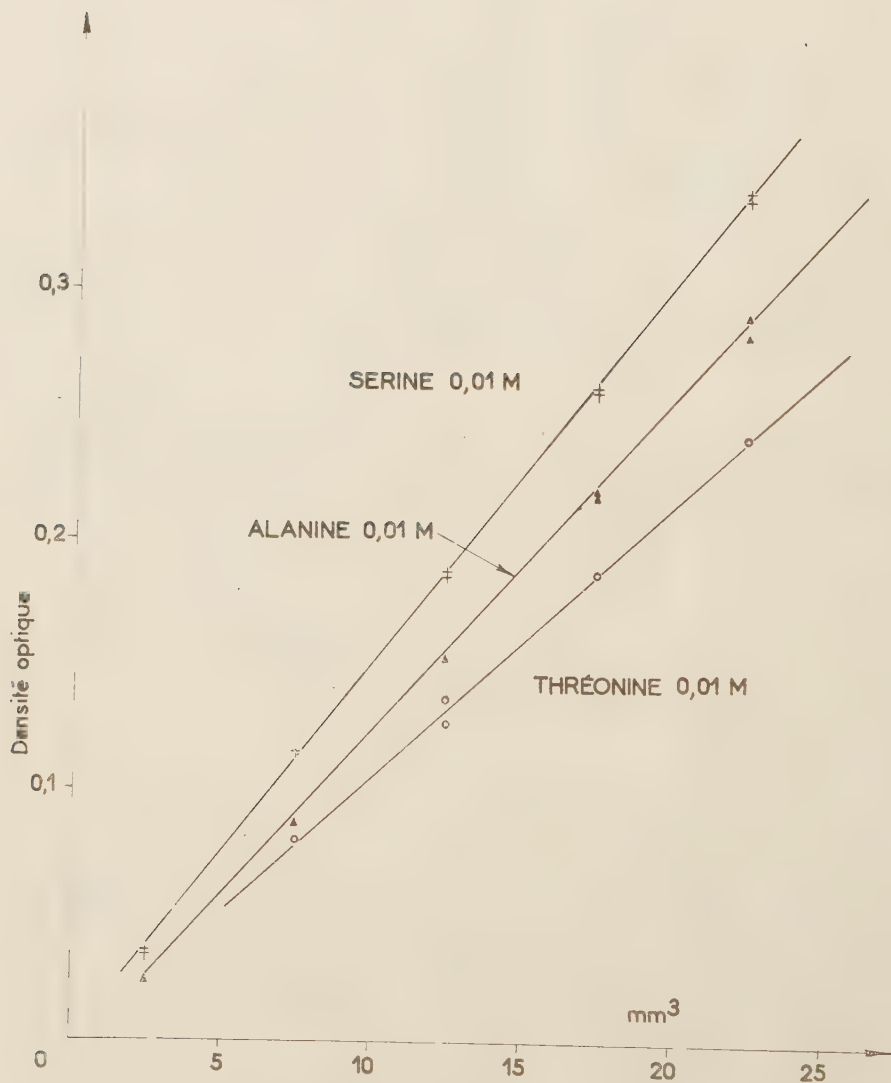


FIG. 4. — Dosage de l'alanine, de la sérine, et de la thréonine par colorimétrie, après réaction avec la ninhydrine, sur papier.

DOSAGE SUR PAPIER

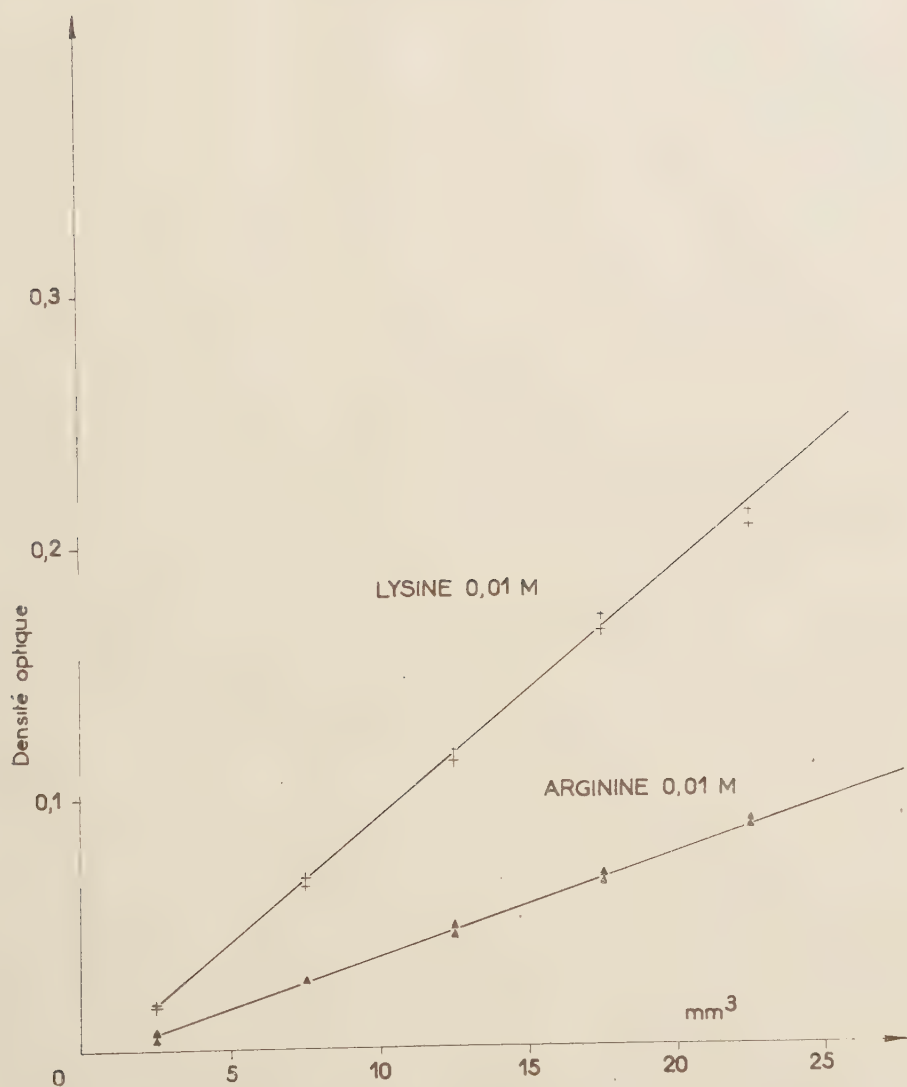


FIG. 5. — Dosage de l'arginine et de la lysine par colorimétrie, après réaction avec la ninhydrine, sur papier.

DOSAGE SUR PAPIER

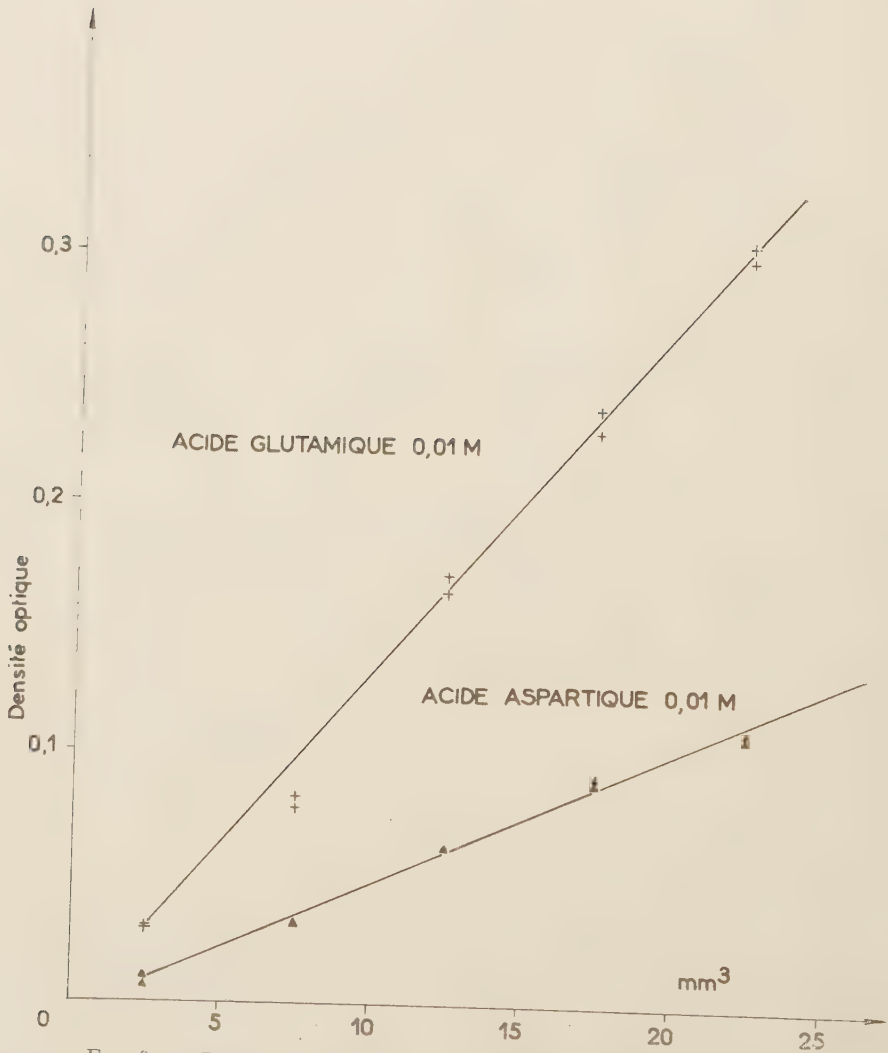


FIG. 6. — Dosage des acides aspartique et glutamique par colorimétrie, après réaction avec la ninhydrine, sur papier.

DOSAGE SUR PAPIER

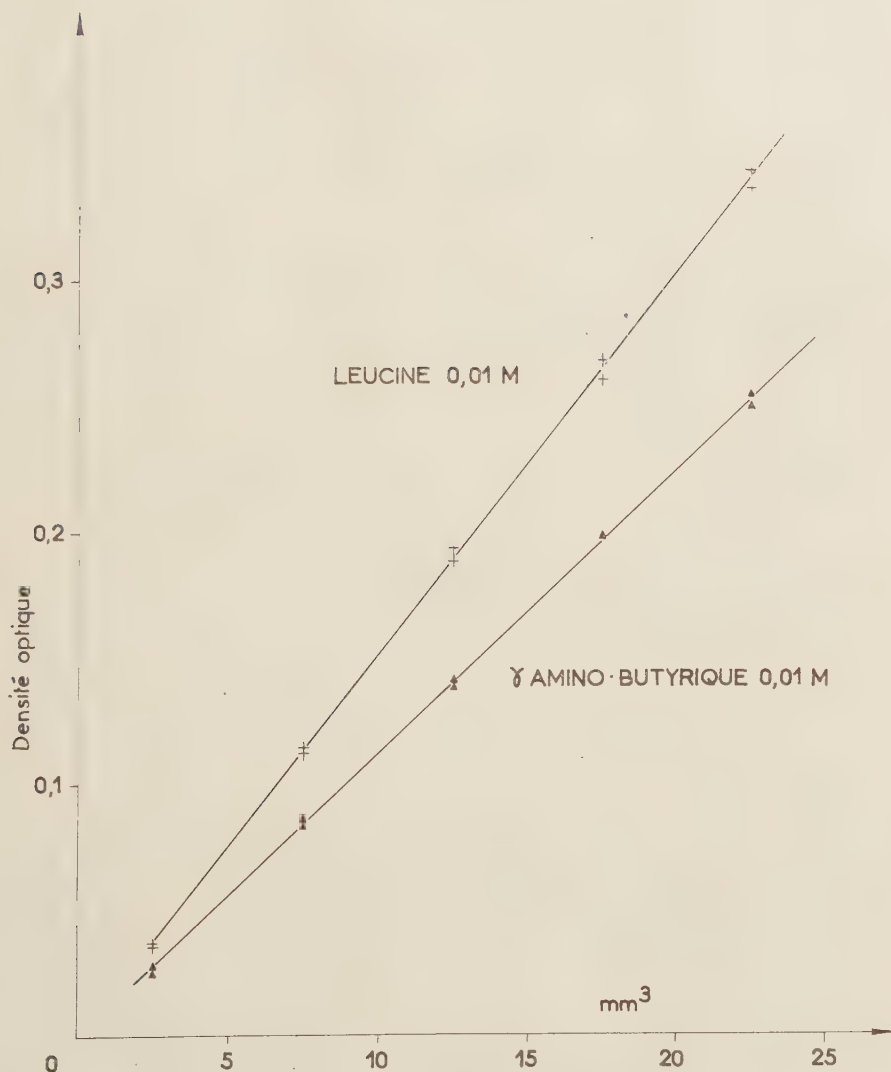


FIG. 7. — Dosage de l'acide γ amino-butyrique et de la leucine par colorimétrie, après réaction avec la ninhydrine, sur papier.

lecture à $\pm 2/10$ de division, soit sur 10 μ l une erreur relative de $\pm 2/100$.

b) *Lecture au colorimètre.* — La coloration suit la loi de Beer, on peut donc admettre que la principale cause d'erreur est due à la fidélité de l'appareil. L'expérience montre que pour un pourcentage de lumière transmise de 80, le colorimètre donne des résultats dispersés entre 78 et 82. Évalué en densité optique, cela représente $0,0969 \pm 0,0011$, soit une dispersion de $\pm 1/100$.

c) *Précision finale.* — Les erreurs relatives ci-dessus ont été calculées pour une prise d'essai de 10 μ l. C'est la prise d'essai la plus petite utilisée pour ce dosage. La prise de 5 μ l n'est utilisée que pour le tracé de la courbe étalon. Les valeurs indiquées peuvent donc être considérées comme donnant les limites les plus larges des erreurs partielles. En amettant qu'elles s'ajoutent, l'erreur globale est de $\pm 3/100$.

III. — CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVE SUR PAPIER

La méthode de dosage des acides aminés sur papier par révélation à la ninhydrine dans des conditions bien standardisées, suivie d'une colorimétrie de l'éluat, est donc aussi précise que la plupart des méthodes colorimétriques habituelles.

Il nous faut, dans le deuxième temps de cette étude, combiner cette méthode de dosage à l'analyse chromatographique.

1° CHOIX D'UN SYSTÈME DE SOLVANTS POUR LA CHROMATOGRAPHIE. — Il s'agit ici de chromatographie descendante à deux dimensions. Un grand nombre de systèmes solvants sont utilisés pour la séparation des acides aminés. Les auteurs cités précédemment (82) ont employé comme premier solvant du phénol saturé d'eau ajusté à pH 5 et comme deuxième solvant un mélange collidine-lutidine (1 : 3) saturé d'eau et ajusté à pH 8,5 mais ils précisent eux-mêmes qu'il n'y a pas de raison pour que tout autre système donnant de bonnes séparations ne soit satisfaisant au point de vue quantitatif.

Il nous a paru intéressant de reprendre la méthode de STEWARD et THOMPSON avec la technique de séparation chromatographique décrite par LÉVY et CHUNG (45) en 1953, qui donne de bons résultats qualitatifs et se présente comme suit :

— premier solvant : phase alcoolique d'un mélange butanol-acide acétique-eau (250-60-250 ml) ;

— traitement du papier par tampon borate à pH 8,3 avant le développement dans le deuxième solvant ;

— deuxième solvant : mélange phénol-métacrésol tamponné à pH 8,3 (150 g de phénol, 300 g de métacrésol, 75 ml de tampon borate pH 8,3).

Les séparations obtenues avec cette technique sont bonnes et reproductibles à condition de renouveler le mélange butanol-eau-acide acétique tous les jours pour éviter son estérification et le mélange phénol-crésol, qui s'acidifie progressivement (le pH passe de 8,3 à 6,5 en 2 semaines) toutes les semaines. Il importe d'autre part d'utiliser du phénol et du métacrésol absolument incolores si l'on veut éviter l'apparition, après révélation à la ninhydrine, d'une teinte de fond jaunâtre nuisible à la précision du dosage.

2° STANDARDISATION DES CONDITIONS DE TRAVAIL. — Plutôt que d'essayer de supprimer les causes de pertes en acides aminés le long de leur cheminement sur le papier, nous avons cherché à uniformiser les conditions de travail de manière à obtenir des pertes constantes et reproductibles.

Comme ces pertes sont proportionnelles à la distance parcourue, il faut fixer celle-ci : nous avons pris 24 heures comme durée de développement dans chacun des solvants. Au bout de ces 24 heures, nous mesurons la distance parcourue par le front de solvant ; si, pour une raison quelconque (par exemple une moindre épaisseur de la feuille ou une surcharge en impuretés), cette distance est supérieure ou inférieure de 2 centimètres à la moyenne adoptée, le chromatogramme est rejeté.

En ce qui concerne la température de développement des chromatogrammes : toutes les séparations sont faites dans une pièce dont la température est réglée à $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ et où l'on prend garde qu'il n'y ait pas de gradient de température.

3° LE MODE OPÉRATOIRE comprend les opérations suivantes :

a) *Chromatographie.*

— Dépôt de la solution sur le papier Whatman n° 1. Un volume de la solution à analyser, compris entre 5 et 25 μ l, est déposé sur le papier par fractions successives, de manière que le diamètre de la tache formée soit de l'ordre de 5 mm.

— Développement par chromatographie descendante dans le mélange butanol-eau-acide acétique (phase supérieure, alcoolique, d'un mélange de 250 ml de butanol, 250 ml d'eau et 60 ml d'acide acétique) pendant 24 heures, à 25° C.

— Séchage du papier, puis pulvérisation de celui-ci à l'aide du tampon borate pH 8,3. Contrairement aux indications données par LÉVY et CHUNG (45) il est indispensable de traiter la totalité de la feuille sans préserver la zone correspondante au cheminement des taches dans le premier solvant. En effet, si l'on ne tamponne pas cette zone, les taches obtenues après la deuxième partition sont mal délimitées et quelquefois même dédoublées.

La pulvérisation est suivie d'un nouveau séchage.

— Chromatographie par le phénol-métacrésol tamponné à pH 8,3 (150 g de phénol, 300 g de métacrésol, 75 ml de tampon borate pH 8,3). Pendant 24 heures, à 25° C.

— Séchage final au-dessus d'un radiateur électrique sous hotte bien ventilée.

b) *Colorimétrie.*

— Pulvérisation de la solution ninhydrine à 2 p. 100 dans Ethanol 95° à 2 p. 100 de collodine-lutidine (1 : 3) ; avant que cette solution n'ait eu le temps de sécher complètement, on met le papier, encore humide, dans la cuve à révélation.

— Mise dans la cuve à révélation. Cette cuve, saturée en vapeurs d'alcool, est placée dans un four à 70° C et est reliée à une bouteille de CO₂. Au bout de 25 minutes, on sort le papier de la cuve. Il doit être encore humide d'alcool ; sinon on ne peut être sûr que le composé coloré ninhydrine-acide aminé, instable à cette température, n'ait pas été détruit en partie. Il faut alors recommencer le chromatogramme.

— Séchage final à l'air libre pendant 1/4 d'heure environ et mise à l'étuve obscure à 25° C pendant 3 heures. L'expérience précédente a montré en effet que l'intensité de la coloration augmentait dans les trois premières heures suivant la révélation pour rester stable ensuite au moins 12 heures. Ceci à condition de garder le papier à l'obscurité afin d'éviter le développement d'une teinte de fond gênante.

— Découpage des taches et élution. On découpe les taches, on les pèse pour avoir une grandeur proportionnelle à leur surface et on les place dans des flacons de 50 ml. On élue par 10 ml d'alcool à 50 p. 100. Au bout d'une 1/2 heure, après plusieurs agitations, on mesure la densité optique de ces éluats au photolorimètre.

Le colorimètre utilisé est un Lumétron (Photovolt Co.). Les lectures ont été faites avec un filtre interférentiel G.A.B. 568 mμ.

On a soin de mesurer la densité optique d'une bande témoin prélevée sur le chromatogramme pour faire la correction de teinte de fond.

4° RÉSULTATS. — Qualité de la séparation chromatographique.

— Elle conditionne la précision du dosage. Un des inconvénients attribués par BLOCK à la méthode de dosage par élution serait précisément qu'elle nécessite une bonne séparation mais il est difficilement concevable qu'une méthode, quelle qu'elle soit, puisse donner de bons résultats à partir d'une analyse chromatographique non satisfaisante.

La technique de LÉVY et CHUNG essayée sur papier Whatman n° 1 donne des taches généralement compactes, aux contours nets. Le schéma d'un tel chromatogramme est représenté à la figure 8, avec les abréviations suivantes :

Acide aspartique	Asp.	Cystéine	Cys.
Acide glutamique	Glu.	Méthionine	Méth.
Asparagine	Asp. A.	Proline	Pro.
Glutamine	Glu. A.	Hydroxyproline	H. Pro.
Sérine	Sér.	Phénylalanine	P. Ala.
Thréonine	Thr.	Tyrosine	Tyr.
Glycine	Gly.	Tryptophane	Try.
Alanine	Ala.	Acide pipécolique	Pip.
β-alanine	β-ala.	Acide 5-hydroxypipécolique	H. Pip.
Acide α-aminobutyrique	α-AB	Citrulline	Citr.
Acide γ-aminobutyrique	γ-AB	Lysine	Lys.
Valine	Val.	Ornithine	Orn.
Leucine	Leu.	Arginine	Argi.

SCHÉMA D'UN CHROMATOGRAMME OBTENU SUIVANT LA TECHNIQUE DE LÉVY ET CHUNG

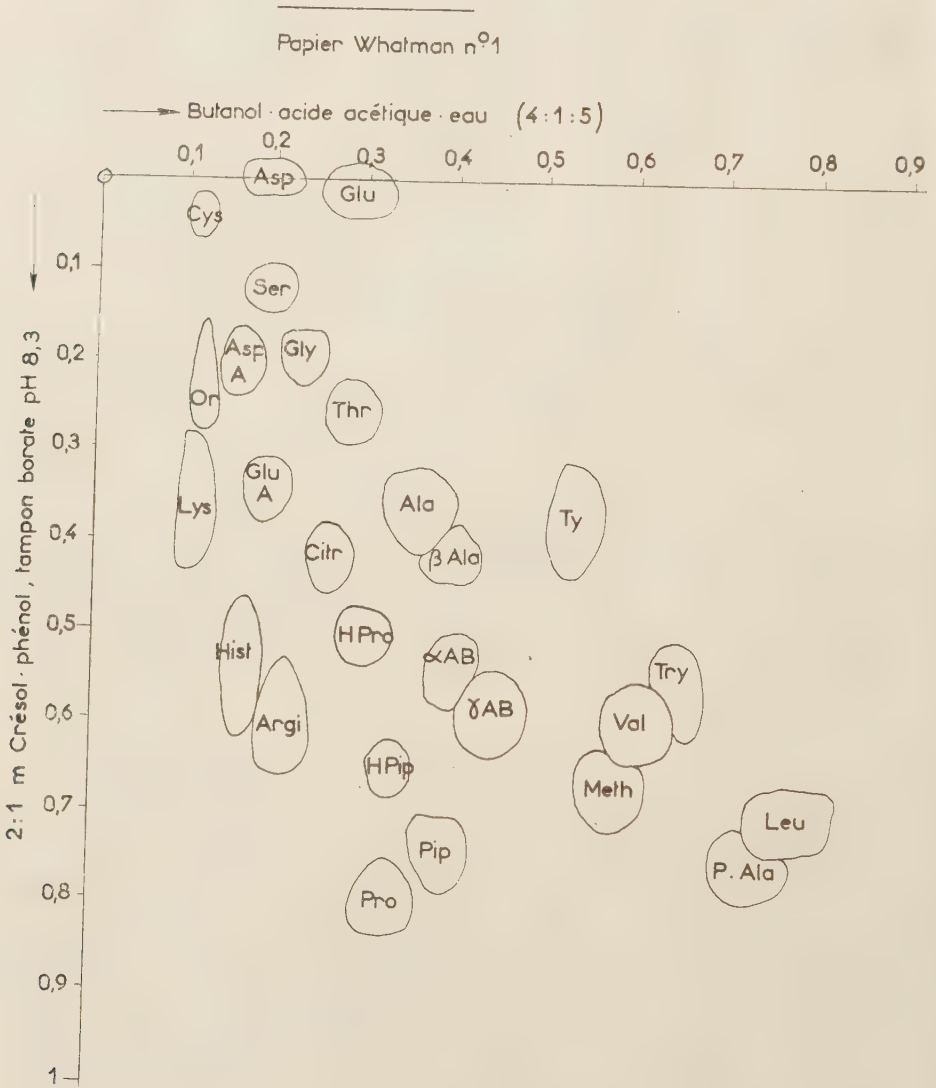


FIG. 8.

Des exemples concrets de séparations chromatographiques obtenues grâce à cette technique sont d'autre part illustrés par les planches I à IX.

Certains groupes d'acides sont difficiles à bien séparer, ce qui rend leur dosage moins précis. Ce sont : histidine-arginine, leucine-phénylalanine, méthionine-valine-tryptophane.

Dans la suite de ce travail, histidine, phénylalanine, méthionine et tryptophane, étant très peu abondants ou inexistant dans les tissus de Carotte, leur dosage n'a pas été source d'ennuis.

Par contre, l'arginine donne parfois des taches au contour incertain ; de même l'ornithine donne une tache allongée.

La proline donne une tache très faiblement colorée en jaune, moins bien caractérisée que celle de l'hydroxyproline, d'une teinte brune, comme l'asparagine.

L'acide pipécolique donne une tache bien délimitée, d'un bleu turquoise caractéristique.

Courbes étalons. — Des courbes étalons ont été établies de la manière suivante (fig. 9 à 12) :

Deux solutions témoins sont préparées :

I		II	
Acide aspartique	0,01 M	Acide glutamique	0,01 M
Asparagine	0,01 M	Sérine	0,01 M
Glycine	0,01 M	Alanine	0,01 M
Thréonine	0,01 M	γ -aminobutyrique	0,01 M
Valine	0,01 M	Cystéine	0,01 M
Leucine	0,02 M	Méthionine	0,01 M
Proline	0,02 M	Tyrosine	0,01 M
Tryptophane	0,02 M	Arginine	0,01 M
Phénylalanine	0,02 M	Citrulline	0,01 M
Histidine	0,01 M		
Lysine	0,01 M		

Avec chaque solution, des chromatogrammes à 5, 10, 15, 20 et 25 μ l sont préparés, en double pour chaque volume. Après révélation, les chromatogrammes non satisfaisants sont rejetés.

Pour faciliter les dosages en série, la répartition de l'alcool à 50 p. 100 dans les fioles contenant les taches à éluer est effectuée à l'aide d'un appareil automatique.

Les courbes étalons qui figurent ci-après résultent donc d'un

ensemble d'au moins 10 chromatogrammes, certaines davantage (chaque point correspond à 1 tache d'un chromatogramme).

Elles sont à comparer avec les courbes étalons du dosage direct des acides aminés sur papier (sans chromatographie). La dispersion des résultats est plus importante comme il était normal de le prévoir. Une estimation de la précision du dosage sera proposée ci-dessous. Il faut remarquer dès maintenant que les acides donnant une coloration faible dans le dosage direct, phénylalanine-arginine, acide aspartique, par exemple, sont *a fortiori* désavantagés dans le dosage après chromatographie.

Le dosage de la proline à 350 m μ a été tenté mais les valeurs trouvées pour la bande témoin prélevée sur le chromatogramme après révélation étaient très élevées et, pour cette raison, le dosage direct de la proline par la méthode de CHINARD (13) a été préféré à la chromatographie quantitative.

En ce qui concerne l'asparagine, son dosage peut être effectué à 392 m μ avec le même colorimètre que les autres amino-acides mais les densités optiques sont faibles.

Sensibilité. -- Elle varie suivant les acides. Pour ceux qui ont un cheminement court sur le papier (faibles R f dans les 2 solvants) comme l'acide aspartique, l'acide glutamique, la sérine, l'alanine, la méthode permet d'estimer 2 à 5 γ .

Cette limite est portée à 5 ou 10 γ pour les corps qui ont des R f importants, comme la valine, la leucine, l'arginine et même l'acide γ -aminobutyrique.

Il faut noter deux points :

— THOMPSON et STEWARD utilisent du papier Whatman n° 1 lavé à l'acide chlorhydrique pour améliorer la séparation chromatographique, diminuer les pertes d'amino-acides par adsorption sur la cellulose au cours de la partition et donc pour rendre le dosage plus sensible et plus précis.

— Ils conseillent, au cas où le papier ne serait pas traité préalablement à l'acide, de pratiquer des témoins internes d'Alanine, par exemple, sur chaque chromatogramme. Et si la densité optique de ces témoins s'écarte de sa valeur théorique calculée d'après la courbe

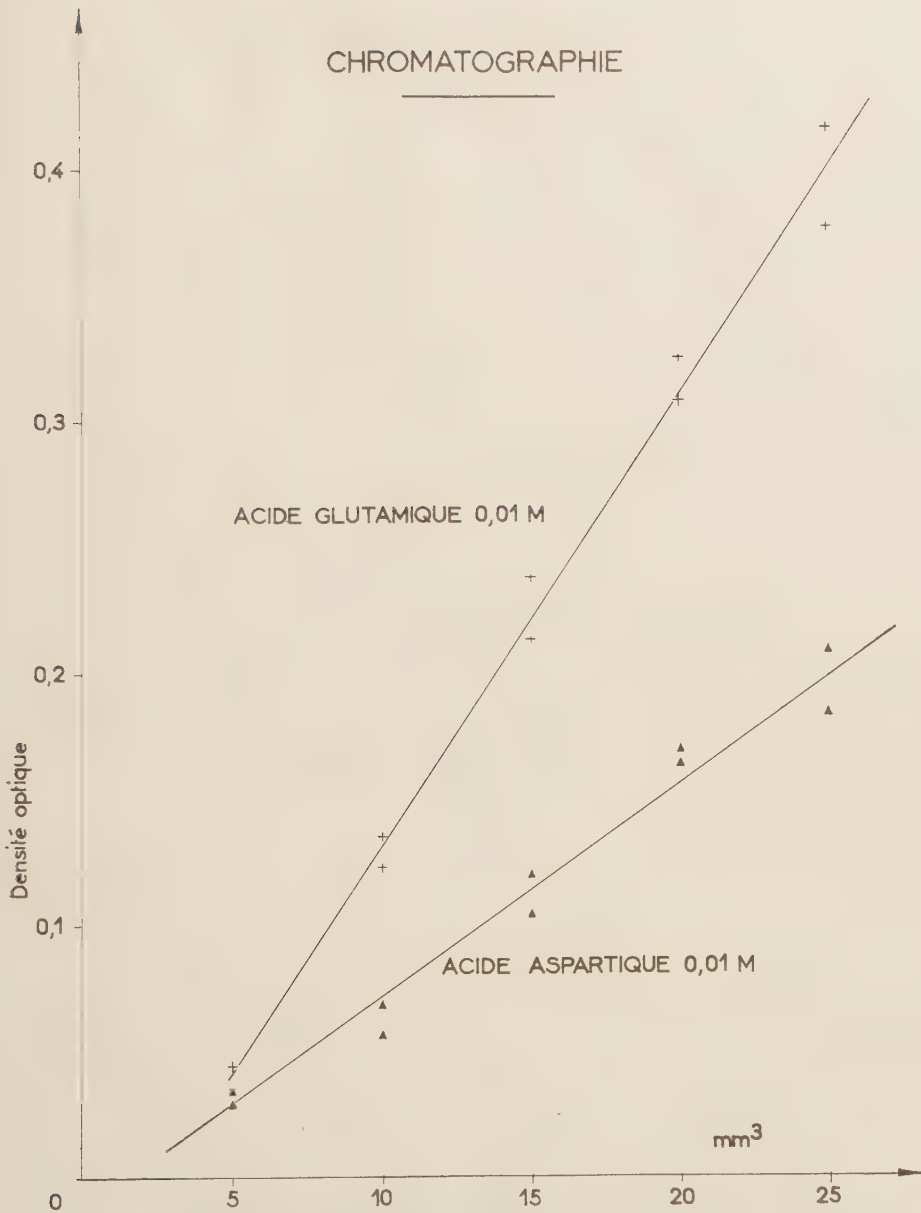


FIG. 9. — Dosage des acides aspartique et glutamique par colorimétrie, après chromatographie sur papier et réaction avec la ninhydrine.

CHROMATOGRAPHIE

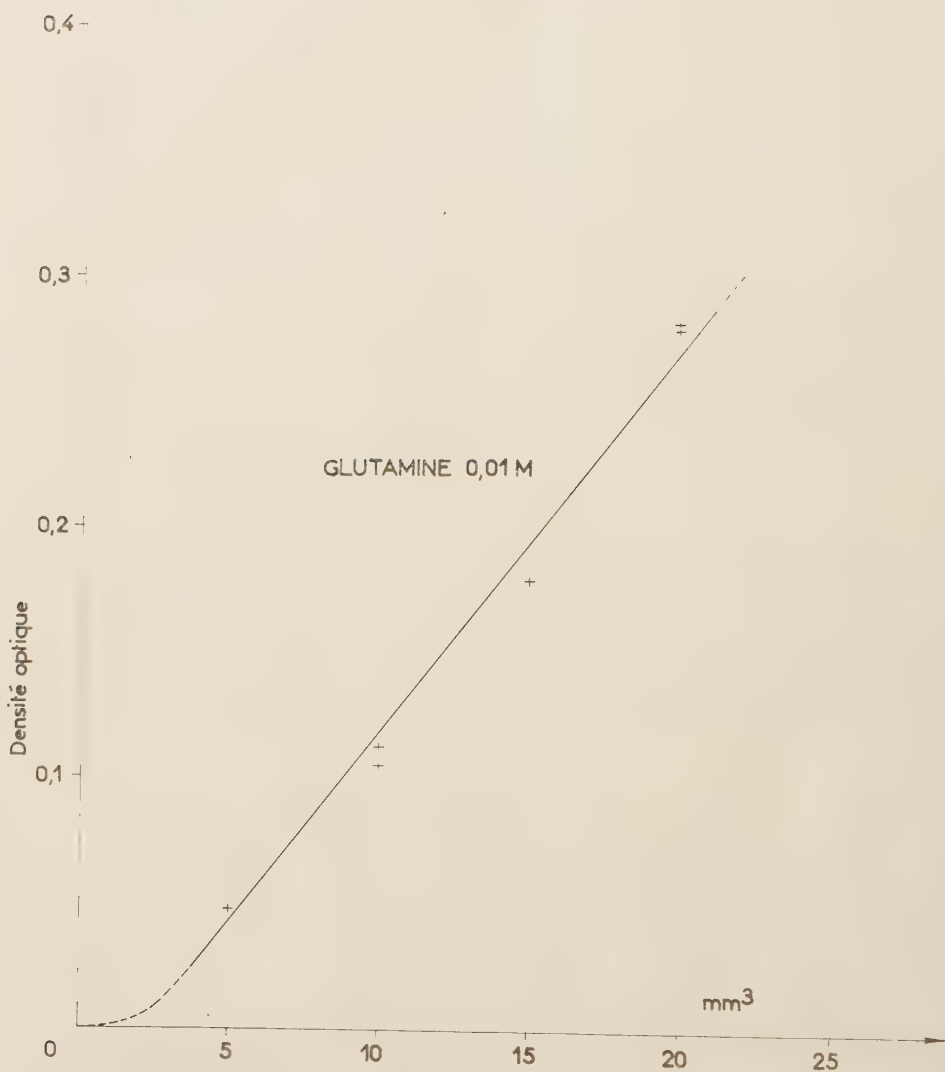


FIG. 10. — Dosage de la glutamine par colorimétrie après chromatographie sur papier et réaction avec la ninhydrine.

CHROMATOGRAPHIE

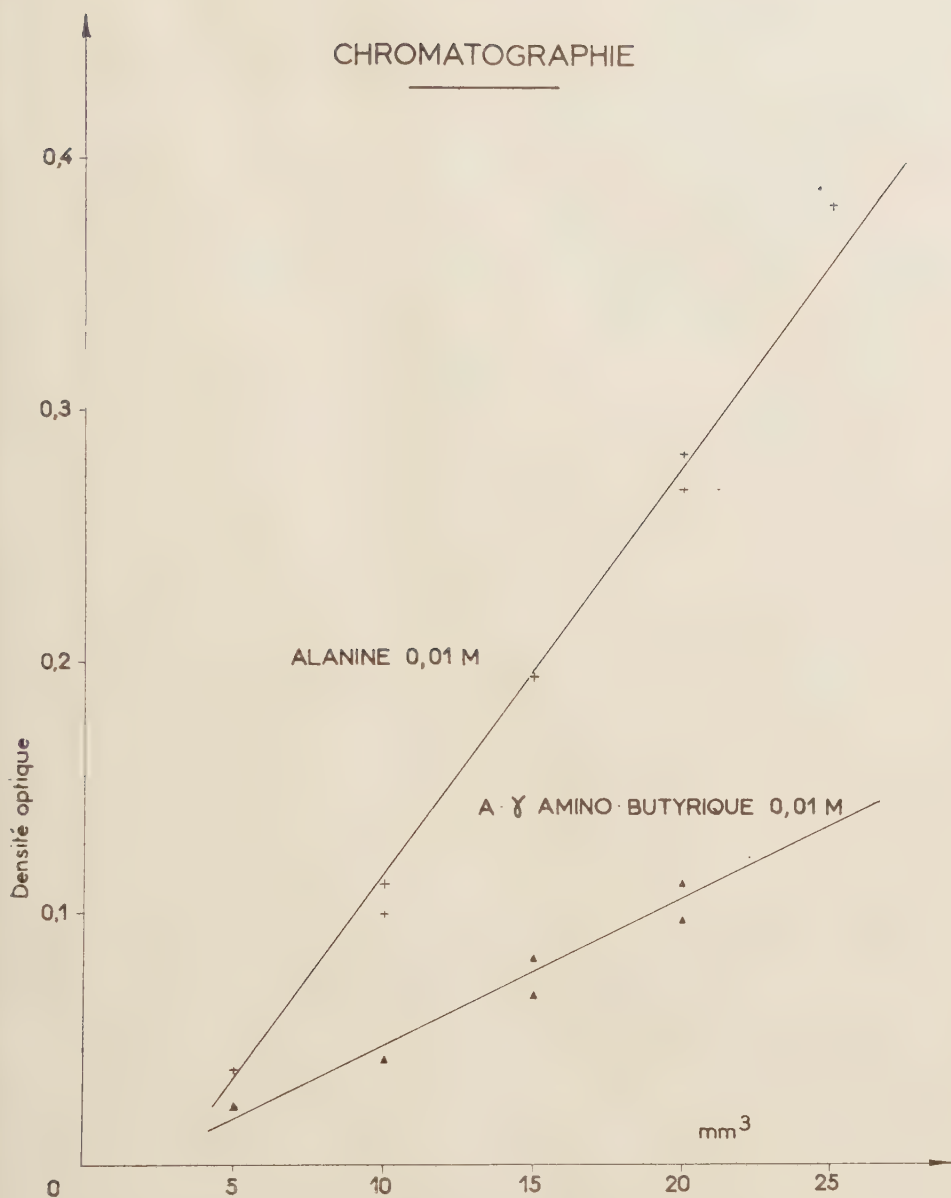


FIG. 11. — Dosage de l'alanine et de l'acide γ amino-butyrique par colorimétrie, après chromatographie sur papier et réaction avec la ninhydrine.

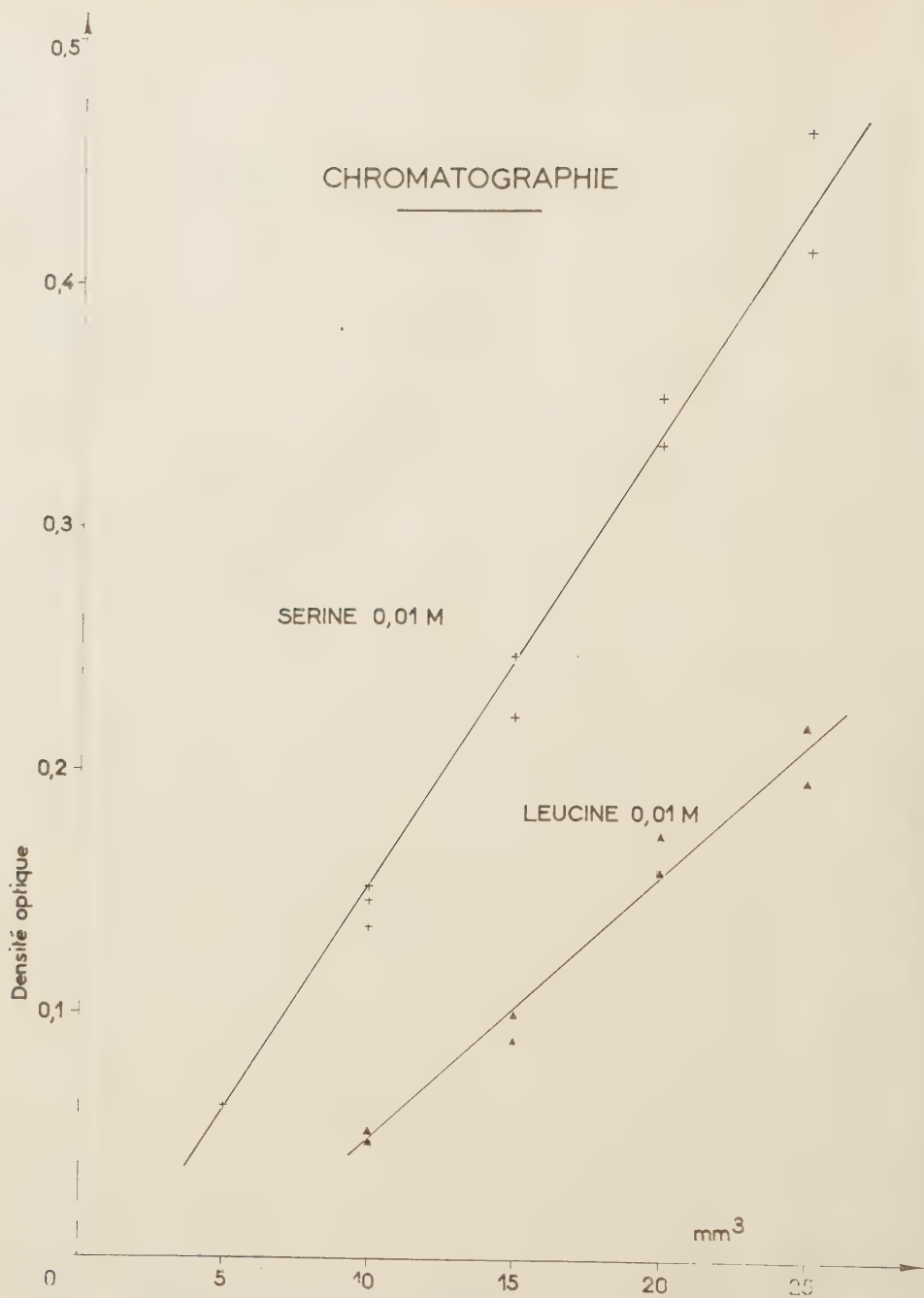


FIG. 12. — Dosage de la leucine et de la sérine par colorimétrie, après chromatographie sur papier et réaction avec la ninhydrine.

étalon, l'ensemble des valeurs obtenues pour les autres acides doivent être corrigées proportionnellement.

En ce qui concerne le premier point, les documents publiés par LÉVY et CHUNG montraient qu'il était possible d'obtenir de très bonnes séparations avec du papier Whatman n° 1 non lavé à l'acide. Certes les résultats étaient légèrement meilleurs avec le Whatman n° 52, papier spécial déjà lavé à l'acide en usine mais cette qualité ne se trouve pas en France. Par raison de simplicité, pour essayer de faire de cette technique un instrument de travail plus maniable que la chromatographie sur colonne, ce lavage préalable du papier Whatman n° 1 a été supprimé.

D'autre part, l'expérience a montré que dans le cas où un chromatogramme témoin donne des résultats quantitatifs aberrants, l'écart par rapport à la valeur théorique a rarement le même sens pour tous les acides. Pour cette raison, l'emploi du témoin interne a été abandonné.

Les précautions préliminaires prises pour ce dosage sont les suivantes :

— lors du développement dans le butanol ou le phénol, les papiers sur lesquels les solvants progressent trop vite ou trop lentement sont éliminés ;

— après révélation, les chromatogrammes qui présentent des taches diffuses ou une teinte de fond bleutée sont rejetés ;

— les dosages sont faits en double exemplaire et tout exemplaire aberrant est recommencé.

Dispersion statistique des mesures. — Une série de dosages témoins a été réalisée avec une solution connue d'acide glutamique : au total 23 chromatogrammes ont été dépouillés. Les résultats expérimentaux ont été soumis à l'analyse statistique.

Nous avons pu ainsi montrer que, si y représente la densité optique et x la teneur en acide glutamique, ces deux variables sont liées par une relation linéaire de forme

$$y = a + bx.$$

$$\text{avec } \begin{cases} b, \text{ coefficient de régression} = 418,52 \\ a = -102,6 \end{cases}$$

Nous avons également déterminé, au seuil de 95 % la limite maximum de l'erreur sur y_m (intervalle de confiance) pour les valeurs de x qui nous ont servi à l'expérimentation (fig. 13).

TABLEAU III
APPRÉCIATION STATISTIQUE DES RÉSULTATS DE LA CHROMATOGRAPHIE
QUANTITATIVE DE L'ACIDE GLUTAMIQUE

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX					
x = teneur en acide glutamique exprimée en γ	3,674	7,348	11,022	14,696	22,044
$X = \frac{x}{3,674}$	1	2	3	4	6
y = densité optique de l'éluat $\times 10^4$	337 350 336	640 782 746 589 820	1 225 1 103 1 093	1 480 1 888 1 704 1 518 1 497 1 400	2 596 2 507 1 884 2 387 2 255 2 821
$\bar{y}$	341	715,4	1 140,3	1 581,1	2 408,3
Limite maximum de l'erreur sur y_m au seuil 95 %					
	x	y_m		erreur en %	
	3,674	315,9 $\pm$ 82		25	
	7,348	734,4 $\pm$ 53		7,2	
	11,022	1 152,9 $\pm$ 82		7,2	
	14,696	1 571,5 $\pm$ 49		3,1	
	22,044	2 408,5 $\pm$ 49		2	

La figure 13 montre les intervalles à l'intérieur desquels il y a 95 p. 100 de chances de trouver la moyenne de chaque groupe de valeurs de y quand x varie.

Précision de la méthode. — Le calcul statistique précédent

montre qu'on pourrait espérer faire des dosages à ± 3 p. 100 à condition de réaliser un nombre suffisant de répétitions.

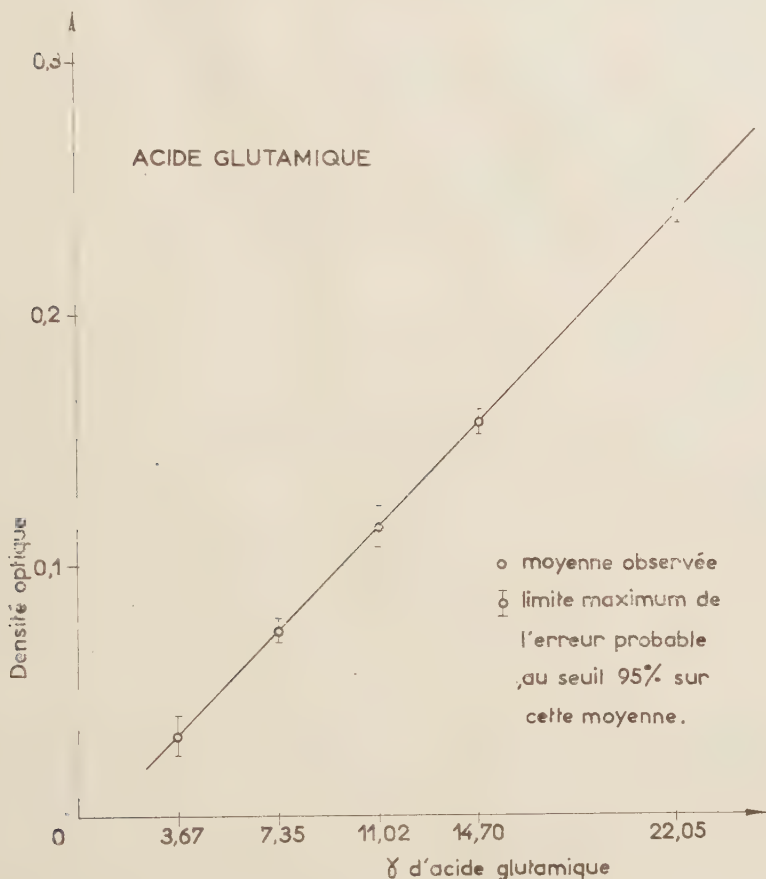


FIG. 13. — Limites de l'erreur sur y_m , valeur moyenne de la densité optique, au seuil de 95 p. 100.

Pratiquement il serait coûteux en temps et en matériel de faire six répétitions pour chaque dosage. Les tableaux suivants IV et V donnent les résultats de dosages faits sur deux séries de deux chromatogrammes.

TABLEAU IV

	EXTRAIT N° 90			EXTRAIT N° 91		
	Dosage n° 1	Dosage n° 2	Différence % moyenne	Dosage n° 1	Dosage n° 2	Différence % moyenne
Acide aspartique. . .	2,65	5,64	± 36 (1)	5,15	4,32	± 8,7 (1)
Acide glutamique. . .	10,45	10,05	1,9	12,28	12,28	0
Glutamine.	5,83	5,48	3,1	4,38	5,48	11,1 (1)
Sérine.	11,45	10,80	2,9	13,5	13,5	0
Alanine.	64	60,5	2,8	72,1	70,2	1,3
Acide γ -aminobuty- rique.	12,5	11,7	3,3	13,9	14,3	2,4
Arginine.	13,7	13,2	1,8	13	12,4	1,4

De ces exemples, les conclusions suivantes peuvent être tirées :
 — pour les valeurs (1) les plus faibles, qui correspondent au seuil de sensibilité de la méthode, la précision est mauvaise, l'erreur relative très importante ;

— pour l'arginine, les dosages de l'exemple A sont concordants, ceux de l'exemple B très divergents. Un nouveau dosage doit être entrepris. Mais on a vu que parfois la tache d'arginine présentait une trainée (queue) nuisible à son dosage. Dans certains cas, le

TABLEAU V

	EXTRAIT N° 118			EXTRAIT N° 119		
	Dosage n° 1	Dosage n° 2	Différence % moyenne	Dosage n° 1	Dosage n° 2	Différence % moyenne
Acide aspartique. . .	21,1	22,3	2,8	30,3	25,6	± 8,4 (1)
Acide glutamique. . .	28	31,3	5,9	20,7	22,3	3,8
Glutamine.	81	83	1,2	38,8	38,8	0
Sérine.	6,9	7,3	2,8	5	4,4	5,4
Alanine.	19,8	21,2	3,4	6,1	5,2	8
Acide γ -aminobuty- rique.	4,2	6,6	22,3 (1)	4,7	3,8	10,6 (1)
Arginine.	20,1	24,7	10,3	15	8,6	26,7 (1)

résultat de la chromatographie a été contrôlé par la méthode de MACPHERSON (49) ;

— pour les autres acides, les écarts varient entre 0 et 8,4 (2).

Il est donc difficile de donner une précision valable pour tous les acides aminés.

Pour ceux qui donnent une faible coloration avec la ninhydrine ou qui ont des *R_f* grands ou encore qui donnent des taches plus ou moins diffuses, l'écart entre la valeur expérimentale donnée par le dosage et la valeur vraie peut être estimé au plus égal à 9 p. 100.

Pour les acides qui donnent une forte coloration avec la ninhydrine, qui ont des *R_f* faibles (0,3) cet écart peut être estimé inférieur à 6 p. 100.

Donc :

Acide aspartique		Acide glutamique	
Acide γ -aminobutyrique		Glutamine	
Méthionine		Sérine	
Valine		Glycine	
Leucine	sont dosés à	Thréonine	sont dosés à
Histidine	$\pm 9 \%$	Alanine	$\pm 6 \%$
Arginine		Citrulline	
Tryptophane		Ornithine	
Tyrosine			
Phénylalanine			

IV. — CONCLUSION

La méthode que nous venons de décrire diffère donc de la technique originale de THOMPSON et présente les particularités suivantes :

— le système de solvants pour la chromatographie est celui de LÉVY et CHUNG et non plus le phénol saturé d'eau, suivi du mélange collidine-lutidine ;

— le papier Whatman n° 1 ne subit aucun lavage préalable et il n'est pas fait usage du témoin interne préconisé par les auteurs : l'expérience a montré en effet que la coloration de celui-ci ne variait pas forcément dans le même sens que celle des autres taches du même chromatogramme ;

— enfin, ayant constaté que la coloration des taches après révélation augmentait pendant 2 heures 1/2 puis se maintenait

stable pendant 12 heures, nous avons arbitrairement choisi une période de 3 heures après la révélation pour faire l'élution.

Il est intéressant de comparer maintenant les avantages et les inconvénients de cette technique avec ceux de la chromatographie sur colonne de résine de MOORE et STEIN :

1° Le dosage après chromatographie sur papier est relativement peu coûteux en temps et en matériel : en 1 semaine, 4 extraits peuvent être analysés (en double exemplaire) au lieu d'un seul (en 1 exemplaire). Il y a au maximum une vingtaine de taches à éluer pour chaque chromatogramme au lieu de 400 tubes à analyser par extrait passé sur colonne.

L'installation du laboratoire n'exige pas de collecteur de fractions mais, à défaut d'une chambre à chromatographie à température constante, une cuve à chromatographie calorifugée.

2° Le dosage sur papier peut être réalisé sur 40 γ seulement d'azote aminé au lieu de 1 000 γ .

3° Par contre, la précision est nettement moins bonne puisque nous venons de voir qu'elle varie de ± 6 à ± 9 p. 100, tandis que la méthode de MOORE et STEIN permet d'atteindre ± 3 p. 100.

4° Un inconvénient de cette méthode est qu'elle reste soumise aux variations de la qualité industrielle de papier employé : à ce sujet nous avons eu des déboires avec certaines livraisons de papier dans lesquelles nous avons constaté que le poids par unité de surface variait de 10 à 12 p. 100 d'un point à l'autre de la même feuille.

Telle quelle, cette technique ne peut sans doute prétendre à une aussi grande précision et à une aussi grande fidélité que la méthode de MOORE et STEIN mais elle a pour elle des avantages précieux. Elle est plus sensible, permet une identification plus simple des différents acides aminés et surtout coûte moins de temps et de main-d'œuvre.

Notons enfin qu'indépendamment de leur séparation chromatographique, le dosage des acides aminés sur papier est une bonne méthode qui permet d'atteindre facilement une précision de ± 3 p. 100.

DOSAGES SPÉCIFIQUES DE L'ARGININE ET DE LA PROLINE

Arginine. — Méthode de MAC PHERSON (49).

1° *Principe.* — L'arginine et les autres composés ayant un radical guanidyle mono substitué donnent une coloration rouge avec le mélange α -naphtol + hypobromite de sodium en milieu alcalin (réaction de Sakaguchi). L'excès d'hypobromite est détruit par une solution d'urée.

2° *Mode opératoire.* — Dans une fiole de 25 ml mettre successivement :

A ml de la solution d'arginine;

(5-A) ml d'eau distillée;

1 ml KOH 10 p. 100;

2 ml naphtol à 0,1 p. 100 dans l'éthanol à 50 p. 100;

1 ml d'urée 5 p. 100. Agiter soigneusement.

Faire couler ensuite très rapidement (pipette à large orifice d'écoulement), 2 ml d'hypobromite de sodium. Cet hypobromite est préparé par addition de 0,7 ml de Brome à 100 ml NaOH 5 p. 100.

Compléter à 25 ml avec de l'eau distillée.

Au bout de 15 minutes, faire la lecture au colorimètre à 500 m μ .

3° *Interférence de composés voisins de l'arginine.* — Dans certaines expériences décrites ci-après, la présence d'acide guanido-butyrique a été signalée ; la méthode de MAC PHERSON donne alors la somme Arginine + Acide Guanido-butyrique.

Proline. — Méthode de CHINARD (13).

1° *Principe.* — A pH 1, la ninhydrine donne avec la proline à chaud un produit de réaction rouge.

2° *Mode opératoire.* — Dans un tube pyrex jaugé, mettre successivement :

1 ml solution à analyser;

1 ml acide acétique glacial;

1 ml d'un réactif préparé comme suit :

40 ml PO_4H_3 6 M + 60 ml d'acide acétique glacial + 2,5 g de ninhydrine.

Mélanger, recouvrir les tubes à l'aide d'une coupelle en verre. Chauffer 1 heure à 100° C. Ajouter 1 millilitre d'acide acétique glacial. Refroidir à la température de la pièce. Ajuster à 5 millilitres avec de l'acide acétique glacial.

La mesure des densités optiques a été réalisée avec un colorimètre LUMETRON muni d'un filtre interférentiel G.A.B. 519 m μ .

3° *Interférences.* — Si leur concentration molaire est dix fois supérieure à celle de la proline, les acides suivants gênent le dosage : Cystéine, Lysine, Hydroxyproline, Citrulline. L'Arginine interfère faiblement. L'Hydroxyproline n'interfère pas significativement.

DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL

Microméthode de Kjeldahl :

1° *Minéralisation.* — La substance à analyser est introduite dans un matras de 100 ml en pyrex avec environ 0,1 g de SO_4Cu anhydre, 0,2 g de SO_4K_2 anhydre et 2 ml d'acide sulfurique concentré.

Le matras est mis sur une rampe de chauffage. L'ébullition est maintenue jusqu'à $\frac{1}{2}$ heure après décoloration complète de la liqueur.

2° *Entraînement à la vapeur* dans un appareil de Parnas et Wagner :

La liqueur est alcalinisée par 5 ml de lessive de soude concentrée à 40° Bé. L'ammoniac entraîné par la vapeur d'eau est recueilli dans 10 ml de ClH 0,02 N.

3° *Dosage en retour* de l'excès de ClH par NaOH 0,02 N en présence de réactif de Tashiro.

DOSAGE DE L'AZOTE NITRIQUE

Nous avons employé la méthode de MORRIS et GONZALES-MAS (57).

1° *Principe.* — Méthode colorimétrique récente (voir aussi SWANN et ADAMS (79)), mise au point pour doser l'azote nitrique dans les tissus végétaux et qui utilise une réaction caractéristique des nitrates, dite réaction de DESBASSYNS de RICHEMONT connue depuis longtemps : en milieu sulfurique concentré les nitrates sont réduits par le sulfate ferreux et il se forme un composé coloré brun-rosé $\text{SO}_4(\text{Fe}, \text{NO})$ stable à froid.

Le spectre d'absorption de ce composé présente un pic étroit à 355 $\text{m}\mu$ et une bande large entre 450 et 550 $\text{m}\mu$.

2° *Mode opératoire :*

— Dans un bécher de 100 ml mettre 10 ml de la liqueur contenant les nitrates extraits des tissus végétaux (par ébullition à reflux ou, d'après les auteurs, par simple broyage dans un homogénéisateur). Ajouter trois gouttes de NaOH 0,5 N et 1 ml d'eau oxygénée 30 p. 100.

— Évaporer jusqu'à environ 1 ml sur Bunsen. Si les pigments colorés de la liqueur n'ont pas tous été détruits par le premier traitement à l'eau oxygénée, le répéter une deuxième fois après avoir rajouté 5 ml d'eau.

— Placer alors le bécher dans un four à 100° C pour achever la dessiccation.

— Ajouter rapidement 20 ml du réactif suivant :

75 ml SO_4H_2 concentré;

25 ml d'une solution aqueuse de SO_4Fe , 7 H_2O à 2 p. 100.

Une coloration rose apparaît.

— Faire la lecture à 355 $\text{m}\mu$ si la coloration est très faible, entre 450 et 550 $\text{m}\mu$ si la coloration est forte.

Le dosage a été fait ici à 537 $\text{m}\mu$.

3° *Interférences.* — Les auteurs signalent que ni les nitrites ni les chlorures ne gênent le dosage mais, par contre, l'acide β -nitro-

DOSAGE DES NITRATES

Méthode MORRIS · GONZALÈS

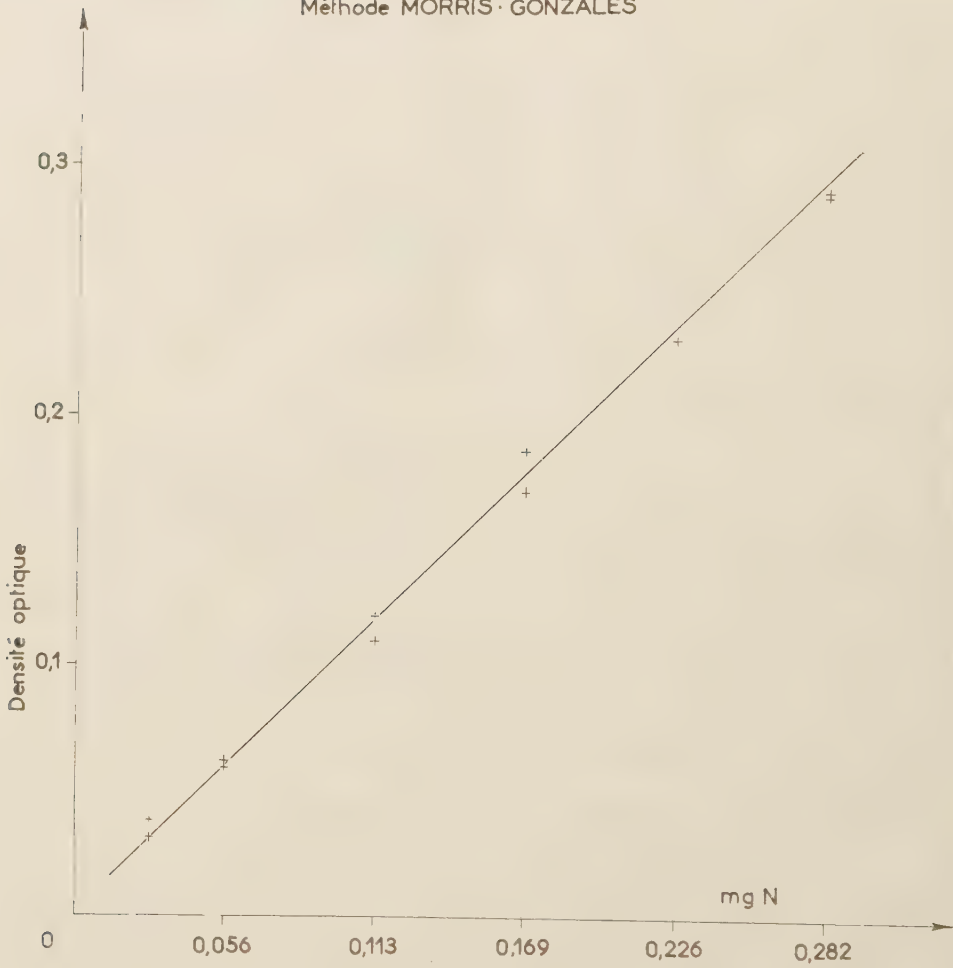


FIG. 14. — Dosage des nitrates par la méthode de MORRIS-GONZALÈS.

propionique, qui existe dans certains végétaux, interfère sérieusement avec les nitrates.

La précision indiquée par les auteurs est de ± 4 p. 100. La courbe étalon obtenue avec une solution de nitrate, donnée ci-contre, confirme la valeur de cette méthode, qui a le mérite d'être par ailleurs extrêmement simple à mettre en œuvre.

CHROMATOGRAPHIE DES ACIDES ORGANIQUES SUR COLONNE DE GEL DE SILICE

La méthode suivie est celle décrite par RAVEUX et BOVÉ (10). Les étapes successives, brièvement résumées, sont les suivantes :

1° *Préparation de la colonne de silice.* — [Dans une fiole d'Erlenmeyer de 150 ml, 5 ml de SO_4H_2 0,5 N sont ajoutés goutte à goutte à 8 grammes de silice Mallinckrodt et les agglomérats de silice sont écrasés soigneusement. On ajoute ensuite 60 ml de chloroforme. La suspension homogène ainsi obtenue est tassée, sous une pression de 30 cm de Hg, par fractions de 5,5 ml dans une colonne de 12 mm de diamètre et 40 cm de hauteur.

2° *Introduction de la prise d'essai d'acides organiques.* — La solution d'acides organiques après concentration à sec dans une fiole, de 50 ml est reprise par 0,5 ml SO_4H_2 1 N dans le cas d'acides libres ou SO_4H_2 5 N dans le cas de sels de Na ou NH_4 . On introduit alors 1 g de silice, on mélange intimement en brisant les agglomérats. Le tout est repris par 10 ml de chloroforme et transféré sur la colonne de silice.

3° *Élution.* — Six mélanges successifs de butanol tertiaire et de chloroforme sont utilisés :

Mélange n° 1	: 120 ml	8 %	butanol tertiaire
— 2	: 120 —	13 %	— —
— 3	: 100 —	20 %	— —
— 4	: 100 —	28 %	— —
— 5	: 100 —	35 %	— —
— 6	: 100 —	40 %	— —

L'éluat est recueilli par fractions de 2 ml au moyen d'un collecteur automatique.

4° *Dosage.* — A chacune de ces 250 fractions, on ajoute 1 goutte de solution de rouge de phénol et 3 ml d'eau décarbonatée. Le titrage est fait avec de la soude 0,005 N.

MESURES DE LA RADIOACTIVITÉ DU ^{14}C SOUS DIFFÉRENTES FORMES

Mesure de la radioactivité du Carbonate de Baryum :

Le $^{14}\text{CO}_2$ dégagé par les cultures de tissus est recueilli dans des absorbeurs garnis de 15 ml de soude 2 N (cf. schéma de l'appareil, p. 59).

Au moment de l'extraction des tissus, cette soude carbonatée est transvasée rapidement dans une fiole jaugée de 200 ml, les eaux de lavage du godet et du papier-filtre servent à ajuster le volume au trait de jauge. Les 200 ml sont ensuite conservés en flacons bouchés hermétiquement.

1° *Précipitation du CO_3Ba .* — Dans une fiole de 50 ml on met successivement :

10 ml de la solution de soude
2 ml de ClNH_4 2N
4 ml de Cl_2Ba 2N

On laisse la précipitation du carbonate se poursuivre pendant 1 heure.

2° *Filtration. Préparation des coupelles de comptage.* — La filtration est faite dans des filtres de Gooch sur des rondelles de papier prélevées à l'emporte-pièce dans des feuilles de Whatman n° 1 et pesées.

Après dessiccation au four à 50° C puis retour à l'atmosphère du laboratoire, les disques de papier sont de nouveau pesés. Le poids du précipité est obtenu par différence.

Les disques de papier sont alors collés par leur pourtour sur des coupelles d'aluminium.

3° *Comptage.* — Les coupelles sont disposées sur un passeur

automatique d'échantillons BONNET-MAURY. Le comptage est fait à l'aide d'un compteur cloche TRACERLAB muni d'une fenêtre en mica de $1,8 \text{ mg/cm}^2$.

4° *Courbe d'autoabsorption du CO_3Ba .* — La forme du précipité est constante et son épaisseur est supposée homogène ; il faut déterminer l'autoabsorption du rayonnement du ^{14}C dans le CO_3Ba .

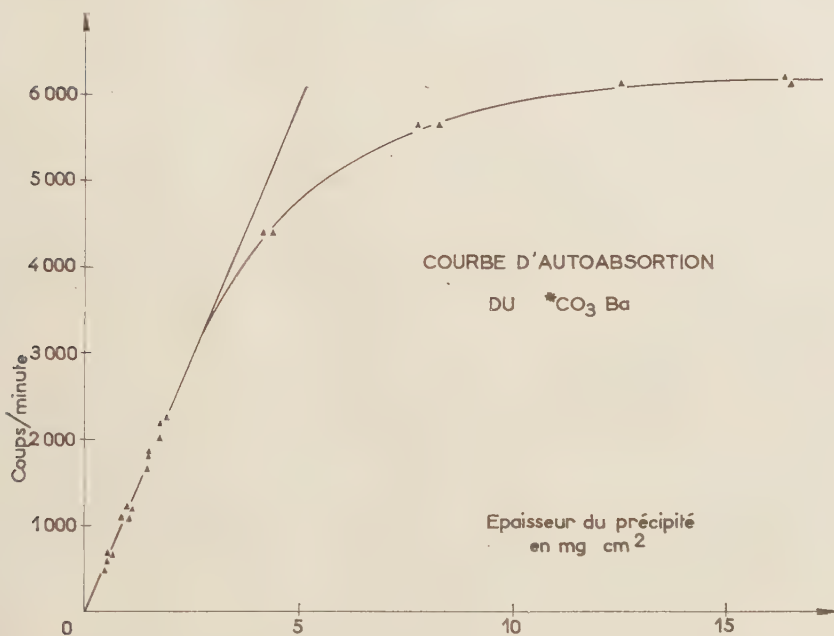


FIG. 15. — Courbe d'autoabsorption du rayonnement β du ^{14}C dans l'épaisseur du précipité de $\text{CO}_3\text{Ba}^{14}$: noter que jusqu'à 3 mg/cm^2 la radioactivité mesurée croît proportionnellement au poids du précipité.

Une gamme de précipités de plus en plus tenus a été préparée à partir de la même solution de soude carbonatée. Chaque coupelle est caractérisée par le poids de CO_3Ba à l'unité de surface et par sa radioactivité.

La figure 15 montre l'allure asymptotique de la courbe donnant la radioactivité mesurée des précipités en fonction de leur épaisseur.

Pratiquement, on peut considérer que, jusqu'à 3 mg/cm^2 , la

radioactivité mesurée croît proportionnellement à la quantité de CO_3Ba : toutes les mesures de radioactivité ont été faites en tenant compte de cette valeur limite.

Mesure de la radioactivité du ^{14}C organique

La radioactivité des différentes fractions organiques (acides aminés, acides organiques, sucres) est mesurée directement sur l'extrait sans passer par l'intermédiaire du CO_3Ba .

1° Radioactivité globale de chacune de ces fractions.

Préparation des coupelles de comptage. — 50 μl de la solution sont déposés, à l'aide d'une micropipette, au centre d'une coupelle d'aluminium préalablement nettoyée avec soin à l'éther. La coupelle est ensuite mise à l'étuve à 50° C, jusqu'à dessiccation complète.

Le résidu sec se présente sous forme d'une très mince pellicule circulaire de diamètre compris entre 6 et 7 mm.

Précision de cette méthode de comptage. — Six coupelles ont été préparées avec 50 ml d'un même extrait d'acides aminés. Les comptages ont été faits à 5 000 coups-minute, à l'aide d'un passeur automatique d'échantillons sous un compteur cloche TRACERLAB dont la fenêtre avait une épaisseur de 1,8 mg/cm².

Les résultats ont été les suivants :

activité nette en coups-minute	
	1 513
	1 455
	1 555
	1 555
	1 475
	1 383
moyenne	1 489 cp-m

L'erreur au seuil 95 p. 100 (loi de FISHER) est donc de 28 coups-minute. Il y a 95 p. 100 de chance que la valeur vraie soit :

$$1\,489 \pm 28, \text{ soit } 1\,489 \pm 1,9 \text{ p. } 100$$

Pratiquement, les mesures sont faites sur trois coupelles et la précision est estimée à ± 4 p. 100.

Autoabsorption. — De manière empirique nous avons cherché à diminuer au maximum l'autoabsorption du rayonnement β dans l'épaisseur du résidu sec, en diluant au préalable la solution à mesurer autant qu'il était possible sans allonger exagérément le temps de passage sous le compteur.

Le tableau VI montre qu'une dilution au 1/10 est suffisante pour atteindre sans correction d'autoabsorption une valeur correcte de la radioactivité et qu'une deuxième dilution au 1/100 n'apporte qu'un faible gain.

TABLEAU VI

MESURE DE LA RADIOACTIVITÉ D'UN EXTRAIT D'ACIDES AMINÉS		
DILUTION	RADIOACTIVITÉ MOYENNE DE 3 COUPELLES EN COUPS-MINUTE	RADIOACTIVITÉ MOYENNE RAPPORTÉE A 1 G DE MATIÈRE FRAICHE EN COUPS-MINUTE
1	1 837	7 460
1/10	253	10 300
1/100	25,5	10 350

2° Autoradiographie des acides aminés. — La détermination de l'activité spécifique de chaque acide aminé n'a pas été faite mais par contre tous les chromatogrammes obtenus avec les fractions aminées solubles ou les hydrolysats de protéines ont été autoradiographiés par contact de 15 ou 30 jours avec des films KODIREX.

B. — TECHNIQUES D'EXTRACTION

EXTRACTION DES ACIDES AMINÉS

Après précipitation des protéines, les acides aminés sont retenus en même temps que les cations métalliques sur une colonne de résine polystyrène-sulfonée du type Permutite 50, fonctionnant en cycle hydrogène, puis élués sélectivement par l'ammoniaque 1 N.

I. — ÉTUDE DE LA RÉSINE PERMUTITE 50

1^o *Volume d'ammoniaque nécessaire pour obtenir une élution complète des acides aminés :*

— une colonne à chromatographie de 10 mm de diamètre est garnie de 5 g de Permutite 50 passée entre les tamis 25 et 50;

— la Permutite est traitée par 40 ml d'acide chlorhydrique 4 N puis lavée à l'eau distillée jusqu'à neutralité de l'éluat. Environ 130 à 150 ml d'eau sont nécessaires;

— on fait alors passer la solution d'acides aminés, ici 1 ml de la solution témoin I et 1 ml de la solution témoin II (cf. p. 83) dilués dans 20 ml d'eau distillée. Vitesse d'écoulement au bas de la colonne : 30 gouttes par minute;

— la colonne est lavée par 150 ml d'eau distillée;

— l'élution est faite au moyen d'ammoniaque 1 N, à la même vitesse d'écoulement que précédemment. L'apparition des acides aminés dans l'éluat est contrôlée au moyen d'une réaction à la goutte sur papier, de la manière suivante : tous les 2,5 ou 5 ml une goutte de cet éluat est déposée sur une feuille de papier-filtre et séchée à l'air chaud; une goutte de ninhydrine à 2 p. 100 dans l'alcool est ensuite déposée au même endroit et par séchage une coloration bleu-violet apparaît en présence d'acide aminé. Dans ces conditions, une goutte de solution ammoniacale donne une tache jaunâtre fort différente d'aspect.

Le pH de l'éluat est parallèlement suivi au papier indicateur.

Les résultats sont schématiquement les suivants :

VOLUME ÉLUÉ EN ML	pH DE L'ÉLUAT	RÉACTION DE L'ÉLUAT A LA NINHYDRINE
0 à 25	acide	réaction négative
25 à 32,5	acide	coloration légèrement rose
32,5	virage	
32,5 à 130	basique	réaction positive très forte au début,
130 à 200	basique	plus de réaction

Dans toutes les extractions réalisées, cette valeur de 130 ml de NH_4OH 1 N pour 5 g de résine Permutite 50 a été retenue.

2° *Rétention des acides aminés sur la Permutite 50.* — Pour certains auteurs, JUTISZ par exemple (40) deux risques se présenteraient : les diacides, faiblement fixés sur la résine, risqueraient d'être perdus au moins partiellement lors du lavage de la colonne par l'eau, avant l'élution proprement dite, tandis que les acides diamminés, très fortement liés à la résine, seraient au contraire difficilement élués par l'ammoniaque.

Nous avons donc été amenés à étudier séparément le cas de chaque amino-acide de la manière suivante :

Deux ml de la solution de l'acide étudié étaient déposés au sommet d'une colonne de 5 grammes de Permutite 50 préparée comme précédemment. Cette colonne était ensuite lavée par 130 ml d'eau et l'élution réalisée par 130 ml d'ammoniaque 1 N. L'éluat recueilli était concentré à sec sous vide à 50° C dans un ballon de 50 ml et repris par 2 ml. L'acide aminé était alors dosé par colorimétrie sur papier suivant la méthode décrite précédemment.

TABLEAU VII
RÉTENTION DES ACIDES AMINÉS SUR LA PERMUTITE 50

	ESSAI N° 1	ESSAI N° 2	ESSAI N° 3
Glycine	95	94,3	—
Sérine	94,5	95,5	—
Acide γaminobutyrique	100	100	100
Méthionine	100	102	101
Thréonine	98,5	100	—
Valine	97	95	96,5
Leucine	95	95	95
Arginine	93	95	—
Lysine	96,5	97	95
Acide aspartique	95,5	97	—
Acide glutamique	100	100	102
Phénylalanine	91,5	90,5	95
Tyrosine	97	100	100
Tryptophane	87,5	85	84,3
Histidine	100	102	99

Pour chaque acide, trois passages sur colonne étaient réalisés. Le tableau VII, ci-après, donne les valeurs moyennes obtenues, exprimées en pourcentage d'acide récupéré.

Plusieurs observations peuvent être faites :

1° En moyenne, dans les conditions opératoires adoptées, les acides aminés sont peu ou pas retenus par la Permutite 50. On récupère généralement entre 95 et 97 p. 100 de l'acide au bas de la colonne. L'acide glutamique, l'acide γ -aminobutyrique, la méthionine, la thréonine sont récupérés totalement.

2° L'arginine n'est pas retenue de façon nettement plus sensible que les autres acides ; le tableau donne une perte moyenne de 6 p. 100.

3° Les diacides ne sont pas entraînés par les eaux de lavage de la colonne.

4° Par contre, le tryptophane n'est récupéré qu'à 85,5 p. 100 en moyenne. Ceci ne semble pas avoir été signalé par ailleurs.

II. — MODE OPÉRATOIRE DE L'EXTRACTION DES ACIDES AMINÉS SOLUBLES ET DE LA SÉPARATION DES PROTÉINES

1° Les tissus, après avoir été pesés, sont découpés en fins morceaux. Un poids connu en est prélevé pour une détermination de la matière sèche.

2° Ils sont alors plongés dans l'éthanol bouillant (à raison de 100 ml d'alcool pour 20 g de tissus frais) et soumis à une ébullition à reflux pendant 15 minutes.

3° Un volume d'eau égal au volume d'alcool est ajouté au mélange précédent et le tout est broyé 1 minute dans un broyeur à hélice avant d'être soumis à une deuxième ébullition à reflux pendant quelques minutes dans le but de dissoudre les amino-acides peu solubles dans l'alcool à 96° bouillant.

4° La suspension est centrifugée ensuite à 2 700 g, 15 minutes. Le culot est mis de côté et le surnageant concentré sous vide à une température inférieure à 50° C. Une nouvelle fraction protéique précipite au cours de cette opération : elle est éliminée par une deuxième centrifugation. Les deux culots de centrifugation sont alors réunis, puis lavés par 60 ml d'alcool à 48° environ et cette suspension est soumise à une troisième centrifugation.

Finalement, les surnageants n° 2 et n° 3 sont réunis.

5° Les surnageants sont alors traités par la Permutite 50 (5 g de

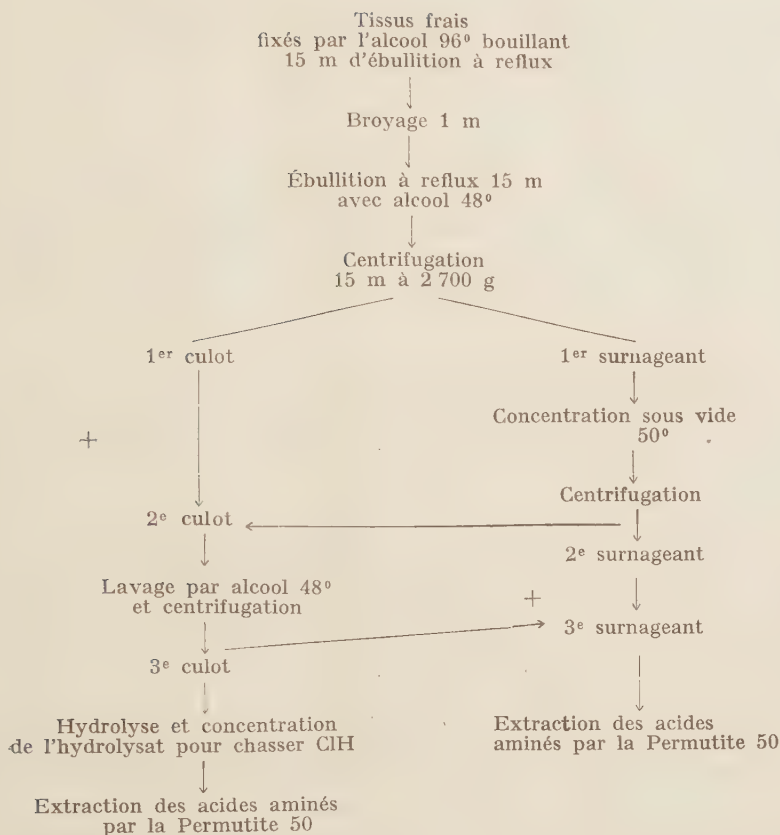


FIG. 16. — *Extraction des acides aminés libres et séparation des protéines.*

résine pour 20 g de tissus frais, au maximum), comme il a été indiqué plus haut. L'éluat ammoniacal (130 ml) est concentré à sec sous vide puis repris par deux fois 2 ml d'eau distillée.

6° Le culot, qui comprend les protéines et les débris cellulaires, est hydrolysé par ébullition à reflux en présence de 100 ml d'acide chlorhydrique 6 N pendant 12 heures. Ensuite, les matières humiques sont séparées par filtration et l'acide chlorhydrique éliminé en grande partie par trois concentrations sous vide successives. La

liqueur finale est neutralisée par la soude 1 N ; sur la moitié de son volume, les acides aminés sont extraits par la Permutite 50.

L'ensemble de ces opérations est résumé dans la figure 16.

EXTRACTION DES ACIDES ORGANIQUES

1° *Principe.* — La fixation des tissus par l'éthanol bouillant est ici remplacée par une congélation rapide dans l'azote liquide, moins sujette à critique quand on veut étudier des composés peu stables.

2° Mode opératoire :

1° Les tissus sont plongés dans l'azote liquide pendant 2 à 3 minutes, dès qu'ils sont sortis des fioles de culture. Puis ils sont placés dans un broyeur à hélice et broyés en présence d'eau à 0° C pendant 1 minute.

2° Le broyat est mis aussitôt en contact avec la Permutite 50 (5 g de résine pour 20 g de tissus frais) dans une fiole d'Erlenmeyer. Cette fiole est placée dans un réfrigérateur et agitée de temps en temps. Au bout de 15 minutes, la suspension est décantée et la résine lavée par deux fois 100 ml d'eau distillée.

3° Une centrifugation à 2 700 g, pendant 15 minutes, permet de séparer alors les protéines et les débris cellulaires. Le surnageant, qui contient les acides organiques, les sucres et les autres substances non ionisées, est ensuite mis en contact de la résine échangeuse d'anions (10 ml de résine Dowex X II pour 20 g de tissus frais). Au bout de 15 minutes, cette suspension est à son tour décantée et lavée par deux fois 100 ml d'eau distillée.

4° La Permutite est ensuite mise dans une colonne à chromatographie garnie au préalable de 2 ml de résine neuve. Il en est de même pour la Dowex. Les eaux de lavage des deux fioles d'Erlenmeyer précédentes sont alors admises à passer successivement sur l'une et l'autre colonne afin d'être débarrassées des traces d'acides aminés ou d'acides organiques qu'elles pourraient encore renfermer.

5° L'ensemble de la fraction non retenue sur Permutite ni sur Dowex est appelé fraction neutre et est constitué principalement par les sucres.

6° La colonne de Dowex est lavée par 100 ml d'eau, éluée par 250 ml d'ammoniaque 1 N, puis par 15 ml de soude 1 N. L'éluat est concentré sous vide à une température inférieure à 45° C jusqu'à 50 ml; il est alors neutralisé par fixation de NH_4^+ et Na^+ sur la Permutite 50. Le pH est fixé à 7 de manière que les acides organiques soient présents sous forme de leurs sels d'ammonium ou de sodium.

7° L'extraction des acides aminés et l'analyse des protéines sont conduites comme indiqué précédemment.

Deuxième partie

RÉSULTATS

Chapitre I

ÉTUDE DU MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Expérience préliminaire réalisée à l'aide d'ensemencements primaires de Carotte

Nous avons tout d'abord recherché l'action que peut avoir le 2.4.D sur l'équilibre azoté de tissus qui prolifèrent bien *in vitro* même en l'absence d'auxine, comme par exemple des fragments de racine de Carotte comprenant l'assise cambiale (GAUTHERET (32)).

MODE OPÉRATOIRE. — Ces fragments sont prélevés aseptiquement sur des Carottes préalablement stérilisées par un trempage d'une $\frac{1}{2}$ heure dans une solution d'hypochlorite de calcium (200⁰ chlorométriques) à 60 g/l et pèsent entre 0,8 et 1 gramme.

Pour chaque concentration et chaque temps de culture, vingt-quatre fragments sont ensemencés. Lors de l'extraction, six fragments servent à la détermination de la matière sèche et de la teneur en azote total, les dix-huit autres sont fixés par l'alcool à 96⁰ bouillant.

Les témoins sont ensemencés sur un milieu sans substance de croissance. Le 2.4.D est utilisé aux concentrations de 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g/m. Les temps de culture sont 14 heures, 2 jours et 14 jours.

Les acides aminés sont extraits selon la technique indiquée plus haut. Un dosage d'azote est fait en double sur cet extrait, puis les acides aminés sont dosés par chromatographie sur papier.

RÉSULTATS. — Nous examinerons d'abord les renseignements

fournis par les dosages d'azote soluble et d'azote total puis les indications données par l'analyse de la fraction aminée soluble.

1° *Azote aminé soluble et azote total.* — Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau VIII et la figure 17.

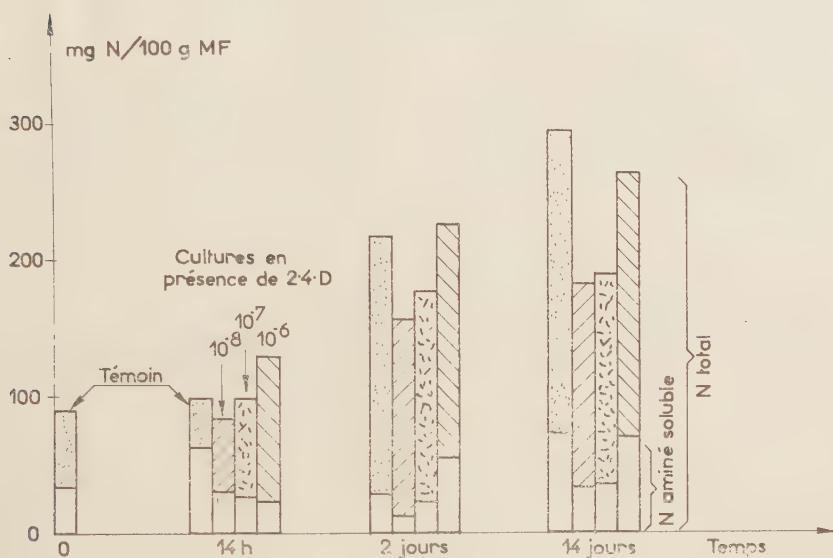


Fig. 17. — Diagramme représentant la variation des teneurs en azote aminé soluble, azote total et, par différence, azote insoluble, dans des fragments de Carotte cultivés en présence de plusieurs concentrations de 2.4.D. Le Témoin est cultivé sans aucune substance de croissance.

Leur examen fait ressortir les faits suivants :

1° Tandis que la teneur en azote total passe, en 14 jours, chez les témoins, de 90 à 300 milligrammes pour 100 grammes de tissus frais, la teneur en azote dans les échantillons cultivés en présence de 2.4.D à la concentration de 10^{-8} n'atteint que 180 milligrammes et 274 milligrammes à 10^{-6} . Le 2.4.D semble donc avoir un effet dépressif considérable sur l'assimilation azotée. Notons que c'est à la plus faible dose utilisée que cet effet est le plus intense.

2° La teneur en azote aminé soluble est toujours plus faible en présence de 2.4.D aux concentrations 10^{-8} et 10^{-7} aussi bien après 14 heures, 2 jours et 14 jours de culture. Par contre, la plus forte

dose entraîne une plus forte teneur en azote soluble dès le deuxième jour.

3° L'azote soluble représente 64 p. 100 de l'azote total dans les tissus cultivés 14 heures en l'absence de 2.4.D contre 38 p. 100 dans les tissus frais. Dans tous les autres cas, cette proportion est plus faible qu'au départ. Sa valeur minimum, à toutes les doses, se situe le second jour.

2° *Acides aminés.* — L'analyse des fragments de tissus frais, qui comprennent, comme il a déjà été vu, à la fois du Xylème, du Phloème et l'assise libéro-ligneuse, donne les résultats suivants (tabl. VII bis) :

TABLEAU VII bis
COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DES FRAGMENTS DE CAROTTE
MIS EN CULTURE

	mg D'ACIDE AMINÉ LIBRE P. 100 g M F
Acide aspartique	23,2
Acide glutamique	36,4
Glutamine	10
Sérine	8,7
Glycine	1,6
Thréonine	6,2
Alanine	25,3
Acide γ -aminobutyrique	3,2
Valine	
Leucine	9,5
Arginine	

L'asparagine existe en quantité comparable à celle de la glutamine. Les acides suivants ont été mis en évidence mais à des concentrations trop faibles pour être dosés : histidine, phénylalanine, cystéine. On note également la présence de proline.

Au cours de la culture *in vitro* de ces fragments, la teneur en chacun de ces acides aminés varie assez largement, comme l'indique le tableau IX. D'une manière générale, ces variations suivent celles de l'azote aminé mais plusieurs particularités sont à remarquer :

— la teneur en glutamine augmente quel que soit le milieu de culture et la durée de l'expérience. Au bout de 14 heures, sur le

TABEAU VIII
COMPOSITION AZOTÉE DE FRAGMENTS DE CAROTTE CULTIVÉS EN PRÉSENCE DE 2.4.D

AGE DE LA CULTURE	0	14 HEURES	2 JOURS	14 JOURS
Concentration du 2.4.D dans le milieu de culture	0	0 10 ⁻⁸ 10 ⁻⁷ 10 ⁻⁶ 0	0 10 ⁻⁸ 10 ⁻⁷ 10 ⁻⁶ 0	0 10 ⁻⁸ 10 ⁻⁷ 10 ⁻⁶ 0
Matière sèche- % matière fraîche	11,4	10,9 11 10	12,4 10,8 9,9 10	12,9 12,1 11,7 14,8
Azote total en mg/10 g de matière sèche	80	78 92 132	181 146 182 234	228 151 165 179
En mg/100 g de matière fraîche	91	100 85 100 132	222 163 181 230	301 180 193 274
Azote aminé soluble en mg/100 g de matière fraîche	34	64 33 27 24	30 15 25 58	76 37 39 75
En % N total	38	61 39 27 24	14 9 14 25	25 21 20 28

TABEAU IX
TENEUR EN ACIDES AMINÉS DE FRAGMENTS DE CAROTTE CULTIVÉS EN PRÉSENCE DE 2.4.D

AGE DE LA CULTURE	0	14 HEURES	2 JOURS	14 JOURS
Concentration du 2.4.D dans le milieu de culture.	0	0 10 ⁻⁸ 10 ⁻⁷ 10 ⁻⁶	0 10 ⁻⁸ 10 ⁻⁷ 10 ⁻⁶	0 10 ⁻⁸ 10 ⁻⁷ 10 ⁻⁶
N aminé soluble en mg/100 g de matière fraîche.	34	64 33 27 24	30 15 25 58	76 37 39 75
Acides aminés en mg/100 g de matière fraîche ;				
Acide aspartique.	23,2	23 16 17	11 8 19 35	56 18 21 26
Acide glutamique.	37	30 25 24	18 18 32 68	40 34 28 21
Glutamine.	10	39 17 8	29 9 23 7	40 34 24 30
Sérine.	9	12 6 7	6 4 7 21	17 9 10 13
Alanine.	25	9 9 18	23 6 9 31	30 29 61
Acide γ-aminobutyrique.	3	14 8 7	11 5 6 18	53 12 29 82
Valine.		15 6 4	5 5 23	17 14 9 15
Arginine.				1 1 9

2.4.D à la concentration de 10^{-6} et 2 jours sur 2.4.D à 10^{-8} , cette concentration diminue, en valeur absolue mais augmente cependant par rapport à l'azote aminé total ;

— de même, l'acide γ -aminobutyrique est de beaucoup plus abondant dans les tissus en culture que dans les tissus frais. Au quatorzième jour, il atteint sa plus forte valeur, avec la plus forte dose de 2.4.D ;

— la teneur en alanine est notablement forte au quatorzième jour en présence de 2.4.D 10^{-6} et sans 2.4.D.

CONCLUSION. — Il est difficile de tirer des conclusions claires de cette expérience, à part la forte synthèse d'alanine et d'acide γ -aminobutyrique observée en fin de culture. Dans tous les tissus, nous constatons une augmentation considérable de la teneur en azote total, qui double au bout de 14 jours. L'action du 2.4.D paraît à première vue très complexe :

— aux faibles concentrations 10^{-7} et 10^{-8} il semble ralentir l'assimilation de l'azote puisque les tissus cultivés sur ces milieux ont par exemple 193 et 180 mg d'azote total (pour 100 g de matière fraîche) contre 301 mg pour les témoins;]

— à la plus forte dose, 10^{-6} , qui est déjà toxique pour ces tissus, il est par contre surprenant de voir que la teneur en azote total est sensiblement la même que dans le témoin.

Mais la nature du matériel biologique utilisé peut être cause d'une assez grande hétérogénéité et masquer ainsi l'effet supposé du 2.4.D ou au moins le dénaturer. En effet, vu le nombre et la taille des fragments nécessaires pour un seul essai (24 fragments), plusieurs racines ont été utilisées au total pour l'ensemble de l'expérience. Il est peu vraisemblable d'autre part que, d'un fragment à l'autre, la proportion de chacun des trois tissus (Phloème, Xylème et tissu cambial) soit restée la même.

Dans le but de préciser ce point, nous avons entrepris l'étude de la teneur en acides aminés de ces différents tissus.

Analyse des tissus de la racine de Carotte

L'objet de ce chapitre est d'étudier la nature biochimique des différents tissus qui constituent les fragments de racine utilisés dans l'expérience précédente, afin d'établir si leur emploi est justifié ou si, au contraire, ils constituent un matériel biologique trop hétérogène.

MODE OPÉRATOIRE. — Les tissus sont prélevés sur des Carottes ayant de 15 à 20 centimètres de long, à deux niveaux : à 1 centimètre sous le collet et à environ 3 centimètres au-dessus de la pointe de la racine. Sur des tranches épaisses de 5 millimètres, trois zones sont séparées au scalpel : le phloème, le xylème et ce que nous nommons zone cambiale, c'est-à-dire la partie colorée en vert foncé, large de 3 à 5 millimètres, constituée des assises cellulaires les plus voisines de l'assise génératrice libéro-ligneuse.

RÉSULTATS (voir aussi (50)). — 1^o Une première série de dosages d'azote total faits en janvier 1956, sur des Carottes conservées en silo, a donné les résultats suivants :

	PHLOÈME	ZONE CAMBIALE	XYLÈME
Collet.	215	350	172
Pointe.	152	280	184

L'assise génératrice et les couches cellulaires voisines se distinguent nettement par leur teneur élevée en azote : les méristèmes secondaires sont donc en cela comparables aux méristèmes terminaux, qui sont riches à la fois en azote total et en azote organique soluble.

2^o Une deuxième série de dosages, faits en octobre, sur des Carottes fraîches, a donné les mêmes résultats. Cette fois, les acides aminés ont été analysés par chromatographie sur papier.

Le tableau X résume ce travail.

Les valeurs trouvées pour l'azote total sont plus faibles que précédemment, comme il est normal pour des racines fraîches, plus riches en eau, mais la richesse de la zone cambiale est relativement

TABLEAU X

LES ACIDES AMINÉS SOLUBLES DES TISSUS DE LA CAROTTE : N ET ACIDES AMINÉS
SONT EXPRIMÉS EN mg/100 g MF

	XYLÈME	ZONE CAMBIALE	PHLOÈME
N total	123	176	118
N aminé libre	35	79	53
N aminé libre			
N total	0,28	0,45	0,45
Acide aspartique	25,6	21,1	31,2
Acide glutamique	22,3	28	35,7
Glutamine	38,8	81	52,5
Sérine	4,4	6,9	8,5
Alanine	5,2	19,8	33,8
Acide γ -aminobutyrique	3,8	4,2	9,3
Valine	5,2	7,8	9,6
Leucine	3	—	8,8
Arginine	8,6	20,1	6,4

aussi grande. Elle s'accompagne d'une teneur élevée en azote aminé soluble, dont les principaux représentants sont la glutamine et l'arginine. L'asparagine, qui ne figure pas sur ce tableau, est également très abondante dans la zone cambiale. Pour les autres acides aminés, la concentration la plus forte se trouve dans le parenchyme libérien et il semble y avoir un gradient de concentration du centre vers l'extérieur de la racine : seul, l'acide aspartique fait exception à cette répartition.

Ce tableau ne donne que les acides aminés les plus importants : dans tous les extraits la glycine et la thréonine figurent également mais en faibles quantités.

En résumé, chacun des tissus analysés peut être caractérisé par sa teneur en azote total et en azote libre, ainsi que par la composition de sa fraction aminée libre. Il possède donc une individualité nette tant au point de vue biochimique qu'histologique.

L'emploi de fragments de racines tels que ceux décrits au chapitre précédent est, de ce fait, peu judicieux, car si la proportion de chaque tissu varie suivant les fragments, les teneurs en azote total et en azote soluble varient également ; bien que chaque analyse soit faite sur dix-huit fragments et que les variations individuelles aient quelques chances de s'annuler les unes les autres, il n'est pas certain que tous les essais soient comparables entre eux.

Métabolisme azoté des tissus de Carotte
cultivés *in vitro*

Pour avoir un matériel d'expérience plus homogène que le précédent, on pourrait envisager de prélever des fragments dans un seul tissu, par exemple le parenchyme libérien.

Or, l'analyse précédente a montré que la teneur en azote de tels fragments dépendait du niveau du prélèvement le long de l'axe pointe-collet et de l'âge de la racine par rapport à la récolte. Comme une seule racine ne suffirait pas à fournir assez de fragments pour l'ensemble d'une expérience, il serait nécessaire d'en prendre plusieurs, d'où une cause d'hétérogénéité supplémentaire.

Il faut enfin considérer qu'au début de la mise en culture de fragments de tissus, il y a une période de stabilisation, de cicatrisation des blessures cellulaires provoquées par le prélèvement et que cette période s'étend sur 10 à 15 jours. Si l'on veut utiliser de tels fragments dans un état physiologique normal, il est nécessaire d'attendre la fin de cette période et alors de les repiquer sur le milieu renfermant la substance de croissance à étudier.

Toutes ces raisons nous ont conduit à utiliser de préférence la souche anergiée de tissus de Carotte isolée en 1937 par GAUTHERET et qui a servi de matériel expérimental à plusieurs études de physiologie.

Le chapitre présent est consacré à l'étude du métabolisme azoté de cette souche de tissus. Il a paru en effet indispensable, avant d'étudier ses réactions vis-à-vis du 2.4.D., de préciser comment elle évolue avec le temps, comment elle se comporte après un repiquage ordinaire (avec fragmentation de la colonie mère) et après un simple transfert, ou transplantation d'un milieu ancien sur un milieu neuf, plus riche en substances nutritives.

ANALYSE D'UNE CULTURE AGÉE DE 80 JOURS. — L'étude d'une culture repiquée depuis 80 jours montre en premier lieu que la teneur en azote soluble est beaucoup plus faible que celle des tissus. L'arginine disparaît ; la glutamine et l'asparagine, de même que l'acide glutamique et, dans une moindre mesure, l'acide aspartique,

voient leur teneur diminuer considérablement. Par contre, l'alanine devient l'acide aminé le plus important et représente à lui seul 41 p. 100 de l'azote aminé libre. On note également une augmentation des teneurs en sérine et en acide γ -aminobutyrique.

Déjà l'étude des ensemencements primaires avait montré une nette augmentation de l'alanine au bout de 14 jours de culture. L'analyse de la souche accoutumée montre le terme de l'évolution profonde des réserves azotées au cours de la culture *in vitro* de ces tissus.

Il est vraisemblable de penser que cette accumulation d'alanine est en relation avec la richesse du milieu de culture en glucose. Au sein des tissus végétaux, la dégradation oxydative de ce sucre constituerait une source d'acide pyruvique, précurseur de l'alanine.

ÉVOLUTION DE LA TENEUR EN AZOTE SOLUBLE ET EN AZOTE TOTAL AU COURS DE LA CULTURE *in vitro*. — Comme tout ce qui est vivant, une culture de tissu évolue avec le temps et peut être caractérisée par son âge. Ici le temps d'origine est l'opération de repiquage : un petit fragment (300 à 400 mg) prélevé à l'aide d'un scalpel sur la colonie-mère est ensemencé sur un milieu nutritif neuf. Deux semaines environ sont nécessaires pour que les blessures dues à cette fragmentation se cicatrisent, après quoi la jeune colonie se développe activement pour atteindre un poids frais de 2,5 g en moyenne au bout de 8 semaines. Quand les tissus sont cultivés en tubes de 20 mm de diamètre et 180 mm de longueur avec 50 ml de milieu, il n'est pas possible de conserver une culture plus de 3 mois sans la repiquer car la masse de tissu occupe toute la section du tube et le milieu de culture s'appauvrit considérablement.

Si l'on veut traiter les tissus ainsi cultivés comme un matériel biologique homogène, il faut au préalable étudier leur comportement en fonction du temps.

A cet effet, des cultures âgées de 20, 38, 58 et 80 jours (comptés à partir du repiquage) ont été analysées. Le tableau XI montre que la teneur en azote total est presque 3 fois plus faible au 80^e jour qu'au 20^e jour, tandis que l'azote aminé soluble ne représente plus que 20 p. 100 au lieu de 40 p. 100 de l'azote total.

TABLEAU XI

ÉVOLUTION DE LA TENEUR EN N TOTAL ET EN N AMINÉ SOLUBLE
DE LA SOUCHE DE CAROTTE DE GAUTHERET AU COURS DE LA CULTURE

AGE DE LA CULTURE EN JOURS	MATIÈRE SÈCHE % MATIÈRE FRAICHE	Nt = N TOTAL mg/100 g MATIÈRE FRAICHE	Ns = N AMINÉ SOLUBLE mg/100 g MATIÈRE FRAICHE	Ns/Nt	N NITRIQUE mg/100 g MATIÈRE FRAICHE
20	9,4	283	109	0,39	18,6
38	8,8	170	71	0,42	
58	8,6	119	23	0,19	
80	6,7	107	22	0,20	2,1

Ces variations sont révélatrices du rôle que joue l'azote dans la croissance des tissus végétaux :

— au moment du repiquage, les fragments issus de culture âgées de 58 ou 80 jours sont relativement pauvres en azote ;

— dans les 3 semaines suivantes, les jeunes cultures sont le siège d'une forte assimilation azotée et plus du tiers de l'azote total se trouve sous la forme aminée soluble. C'est alors que commence la phase de croissance par division cellulaire :

— la teneur en azote nitrique diminue très fortement entre le 20^e et le 80^e jour ;

— progressivement, la teneur en azote total diminue et finalement la teneur en eau s'accroît, au fur et à mesure que diminuent les divisions cellulaires et qu'augmente le nombre des cellules.

Il est intéressant de rapprocher ces résultats de l'analyse de la zone cambiale donnée précédemment : dans les deux cas, il s'agit de tissus en voie de prolifération et tous les deux sont riches en azote (total et libre).

L'analyse chromatographique montre que presque tous les acides aminés participent à la décroissance absolue et relative de la fraction azotée soluble au cours de la culture. L'alanine et l'acide glutamique (tabl. XII) sont particulièrement affectés, tandis que l'acide aspartique est pratiquement stationnaire.

Il est donc important de tenir compte de l'âge des cultures

TABLEAU XII

ACIDES AMINÉS SOLUBLES DE LA SOUCHE DE CAROTTE AU COURS
DE LA CULTURE *in vitro*
EXPRIMÉS EN mg/100 g DE MATIÈRE FRAICHE

	20 JOURS	38 JOURS	80 JOURS
Acide aspartique.	11,7	10,2	16,3
Acide glutamique	50,3	25	8
Glutamine.	31,6	10,7	10,6
Sérine.	52,1	43,2	13,6
Glycine	+	+	+
Thréonine	+	+	+
Alanine	26,2	213	57
Acide γ -aminobutyrique.	20	18	11,6
+ = acides aminés présents, mais non dosés			

de tissus dans les expériences à entreprendre et une comparaison stricte n'est possible qu'entre cultures arrivées au même stade de développement.

TRANSPLANTATION (SANS FRAGMENTATION) D'UNE CULTURE SUR UN MILIEU NEUF. — Pour étudier l'action du 2.4.D sur le métabolisme azoté de ces cultures de tissus, il est nécessaire de pratiquer une transplantation c'est-à-dire le passage de la colonie sans fragmentation, sans blessure mécanique, sur un milieu contenant l'herbicide à la dose désirée.

La plupart des expériences ont été réalisées avec des cultures de 60 jours, ayant un poids frais unitaire de 2 grammes environ. Ces cultures ont en partie épuisé leur milieu de culture d'origine et le fait de les mettre au contact d'un milieu nutritif neuf est susceptible de provoquer une réaction physiologique qui risque de masquer ou de dénaturer l'effet propre au 2.4.D.

Pour préciser ce point, des transplantations de cultures âgées de 2 mois ont été faites sur des milieux neufs ne contenant, comme substance de croissance, que l'A.I.A. à la dose habituelle de 10^{-8} , puis l'expérience a été étendue à la transplantation de tissus jeunes ayant 20 ou 38 jours seulement.

TABLEAU XIII

INFLUENCE DE LA TRANSPLANTATION SUR LES TENEURS EN AZOTE TOTAL (Nt)
ET AZOTE AMINÉ SOLUBLE (Ns) EXPRIMÉES EN mg/100 g MF

	AVANT TRANSPLANTATION			APRÈS TRANSPLANTATION		
	Ns	Nt	Ns/Nt	Ns	Nt	Ns/Nt
Cultures âgées de 20 jours, après 8 jours de trans- plantation.	109	283	0,39	92	341	0,27
Cultures âgées de 38 jours, après 8 jours de trans- plantation.	71	170	0,42	98	242	0,41
Cultures âgées de 60 jours, transplantées 1/2 j. . .	22,8	119	0,19	38,2	113	0,34
transplantées 4 j . . .	id.	id.	id.	47,5	150	0,32

Dans chaque cas, les teneurs en azote total et en azote aminé libre ont été déterminées, par la technique de Kjeldahl. Le tableau XIII montre que la transplantation est toujours suivie d'un gain en azote total.

Il semble donc que l'appauvrissement du milieu de culture ou au moins de la zone de gélose la plus proche de la colonie soit assez rapide : mise au contact d'un milieu neuf, celle-ci assimile rapidement le supplément d'azote qui se trouve à sa disposition. Dans les cultures de 20 jours, la synthèse des protéines semble suivre la vitesse d'assimilation de l'azote nitrique, puisque la teneur en azote aminé soluble reste la même en valeur absolue ; par contre, elle est plus lente pour les cultures âgées de 38 jours, qui voient leur azote soluble augmenter.

Avec les cultures âgées de 60 jours, un phénomène curieux apparaît : avant d'observer une augmentation d'azote total on constate, dans les premières heures qui suivent la transplantation, une solubilisation assez considérable de l'azote protéique. Le rapport Ns/Nt a presque doublé au bout de 12 heures. Il est sensible-

TABLEAU XIV

TRANSPLANTATION DE LA SOUCHE DE GAUTHERET SUR MILIEU SANS NITRATE :
ÉVOLUTION DE LA COMPOSITION AZOTÉE D'UNE COLONIE ÂGÉE DE 60 JOURS

	AZOTE AMINÉ SOLUBLE EN mg/100 g DE MATIÈRE FRAICHE = Ns	AZOTE TOTAL EN mg/100 g DE MATIÈRE FRAICHE = Nt	Ns/Nt
Avant transplantation . .	21,8	107	0,20
Après transplantation sur milieu sans nitrate :			
1/2 j.	28	88,3	0,32
1 j.	32	95,2	0,34
7 j.	42,2	71,3	0,59

ment le même au 4^e jour mais cette fois l'azote total a, lui aussi, progressé.

Il était important de préciser si cette augmentation de la teneur en azote soluble correspondait au premier stade d'une assimilation accrue de l'azote minéral du milieu extérieur.

Pour cela, une expérience identique de transplantation fut réalisée mais cette fois sur un milieu dépourvu de nitrate. Or, cette réaction du tissu à la transplantation se produit même si le milieu neuf est dépourvu de nitrate. Le tableau XIV montre que, dans ce cas aussi, l'azote aminé soluble augmente considérablement dans les 12 heures qui suivent. Le phénomène prend, au 7^e jour, une allure particulièrement aigüe, puisqu'à ce moment 59 p. 100 de l'azote total sont sous forme aminée soluble.

CONCLUSIONS. — 1^o Ces résultats montrent que la comparaison n'est possible qu'entre des cultures du même âge. Toutefois, les variations de composition en substances azotées sont plus rapides au début de la culture, dans les 6 premières semaines qui suivent le repiquage, que dans le mois suivant. Pratiquement, le plus grand nombre de nos expériences ont été réalisées à l'aide de cultures âgées de 7 à 9 semaines.

2^o La transplantation d'une culture de n'importe quel âge sur

un nouveau milieu nutritif s'accompagne toujours d'une augmentation de la teneur en azote soluble. Ce phénomène ne correspond pas à une accumulation accrue d'azote aux dépens du milieu de culture, puisqu'il se produit même si ce nouveau milieu est dépourvu d'azote.

Chapitre II

ACTION COMPARÉE DE L'AIA ET DU 2.4.D SUR LE MÉTABOLISME AZOTÉ DES TISSUS CULTIVÉS IN VITRO

Étude de la fraction aminée soluble

L'étude de l'influence du 2.4.D sur le métabolisme de la souche de Carotte cultivé *in vitro* a été divisée en deux parties : la première correspond à l'analyse du comportement de la fraction aminée soluble, la deuxième à celle de la fraction azotée insoluble (54).

Dans cette première partie, l'action du 2.4.D a été suivie sur des cultures âgées de 8 à 9 semaines et transplantées pendant un temps variant de 12 heures à 8 jours, soit sur un milieu nutritif normal, contenant l'AIA ou le 2.4.D à différentes concentrations, soit sur un milieu sans nitrate.

I. — LA TRANSPLANTATION SUR LE MILIEU AU 2.4.D DURE MOINS DE 4 JOURS

Des cultures âgées de 60 jours environ sont transplantées sur les milieux nutritifs complets (c'est-à-dire avec nitrate) renfermant le 2.4.D à la concentration de 10^{-6} . Les témoins sont constitués par des cultures de même âge transplantées sur un milieu à l'AIA à la concentration de 10^{-8} . Au bout de 12 heures, 24 heures, 2 jours et 4 jours, les tissus sont extraits des tubes, pesés et les acides aminés extraits selon la technique habituelle.

Dix fragments sont utilisés pour chaque essai, soit environ 20 grammes de matière fraîche.

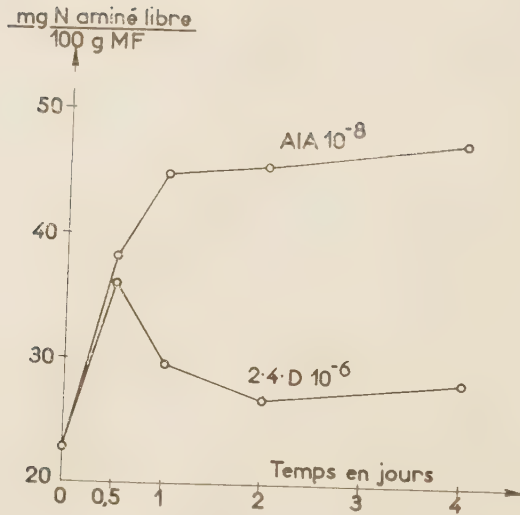


FIG. 18. — Variation de la teneur en azote aminé libre (soluble) des tissus de Carotte anergisés, repiqués sans fragmentation, c'est-à-dire transplantés sur des milieux contenant soit de l'AIA à 10^{-8} , soit du 2.4.D à 10^{-6} .

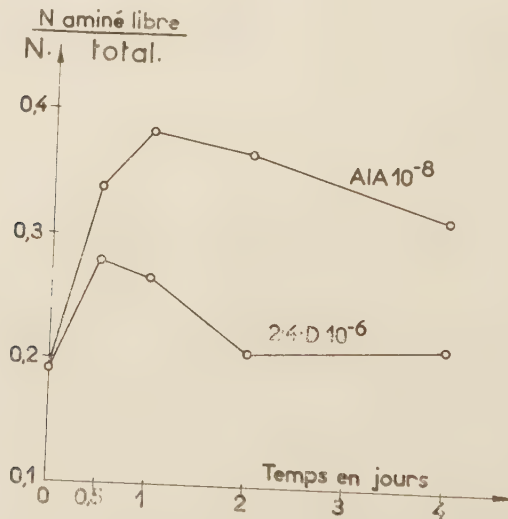


FIG. 19. — Mêmes résultats exprimés en azote libre par rapport à l'azote total.

TABLEAU XV

ACTION COMPARÉE DE L'AIA ET DU 2.4.D SUR LA COMPOSITION AZOTÉE DE LA SOUCHE
DE TISSUS DE CAROTTE
AZOTE LIBRE ET AZOTE TOTAL EXPRIMÉS EN mg D'AZOTE
POUR 100 g DE MATIÈRE FRAICHE

TEMPS EN JOURS	MILIEU AIA 10 ⁻⁸			MILIEU 2.4.D 10 ⁻⁶		
	N libre	N total	$\frac{N \text{ libre}}{N \text{ total}}$	N libre	N total	$\frac{N \text{ libre}}{N \text{ total}}$
0	22,8	119	0,19	—	—	—
1/2	38,2	113	0,34	36	129	0,28
1	44,8	117	0,38	29,5	111	0,27
2	45,5	124	0,37	26,7	129	0,21
4	47,5	150	0,32	28,2	132	0,21

Le tableau XV et les figures 18 et 19 montrent que le 2.4.D a une action nette sur l'équilibre entre l'azote aminé soluble et l'azote protéique. Nous retrouvons dans les premières heures de culture ce phénomène de solubilisation de l'azote protéique déjà observé, mais il rétrograde dès le deuxième jour sous l'effet du 2.4.D. Le gain en azote total est plus faible que chez le témoin, cultivé sur AIA, et le rapport de l'azote soluble à l'azote total qui passe de 0,32 à 0,21 exprime bien le sens de l'action du 2.4.D.

TABLEAU XVI

ACTION COMPARÉE DE L'AIA ET DU 2.4.D SUR LA COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS
DE LA SOUCHE DE TISSUS DE CAROTTE
ACIDES AMINÉS LIBRES EXPRIMÉS EN mg
D'ACIDE POUR 100 g DE MATIÈRE FRAICHE

	24 H SUR AIA 10 ⁻⁸	24 H SUR 2.4.D 10 ⁻⁶
Acide aspartique.	12,4	7
Acide glutamique	23,5	15,2
Glutamine.	12,9	4,8
Sérine.	28,3	14,7
Glycine.	3,6	2,7
Thréonine.	5,1	3,7
Alanine.	166	97,5
γ-aminobutyrique	7,5	2,9
Valine	4,2	2,1

La même action a été retrouvée avec le 2.4.D à la concentration de 10^{-8} mais plus atténuée. Ainsi, après 2 jours de culture, le rapport N_s/N_t est de 0,37 pour AIA à 10^{-8} , 0,26 pour 2.4.D à 10^{-8} et 0,21 pour 2.4.D à 10^{-6} .

L'analyse chromatographique (tabl. XVI) montre que l'ensemble des acides aminés participe à cet appauvrissement relatif. Il faut noter en particulier la régression sensible sous l'action du 2.4.D de l'alanine qui représente, comme on l'a vu, la plus grande part de cet azote libre, ainsi que de l'acide glutamique et de la sérine. Dans l'ensemble cependant, les proportions relatives des différents constituants de cette fraction sont peu modifiées.

Examinons maintenant ce qui se passe quand on prolonge l'expérience de transplantation jusqu'au 8^e jour.

TABEAU XVII

ACTION COMPARÉE DE L'AIA ET DU 2.4.D SUR LA SOUCHE DE TISSUS DE CAROTTE APRÈS 8 JOURS DE TRANSPLANTATION

	SUR MILIEU AIA 10^{-8}	SUR MILIEU 2.4.D 10^{-6}
Azote aminé soluble en mg 100 g de matière fraîche	13,6	34,5
Acides aminés en mg 100 g de matière fraîche :		
Acide aspartique	6,5	4,8
Acide glutamique	17	13,1
Glutamine	14,2	10,1
Sérine	19	16,3
Glycine	traces	traces
Thréonine	4,7	3,4
Alanine	121	103
Acide γ -aminobutyrique	13,9	15,4

II. — LA TRANSPLANTATION DURE 8 JOURS

Cette fois, c'est la plus faible dose de 2.4.D, soit 10^{-8} , qui a été employée. Le tableau XVII résume les résultats de cette expérience.

Ici encore, nous constatons que la dépression en azote aminé libre observée au cours des 4 premiers jours est aussi sensible au

8^e jour. L'ensemble des acides participent à cette diminution, sauf toutefois l'acide γ -aminobutyrique. Comme précédemment, la variation observée sur la teneur en alanine est la plus forte en valeur absolue.

III. — LA TRANSPLANTATION EST FAITE SUR MILIEU SANS NITRATE

Si nous reprenons l'examen des résultats de l'expérience du paragraphe 1, les courbes n^o 18 et n^o 19 suggèrent l'existence de deux phénomènes distincts : tout d'abord une solubilisation de l'azote protéique, qui se produit même si l'on soustrait toute source d'azote du milieu de repiquage puis, à partir de la 12^e heure environ, une phase de réintégration de l'azote soluble dans les protéines. A ceci vient s'ajouter le fait que, dès le 3^e ou le 4^e jour, les cultures sont le siège d'une assimilation d'azote assez importante aux détriments du milieu de culture.

Ces variations montrent qu'il existe des relations étroites entre l'azote aminé soluble et l'azote minéral du milieu de culture d'une part, entre l'azote aminé soluble et l'azote protéique d'autre part. Il est jusqu'ici difficile de préciser dans quel sens intervient le 2.4.D, soit pour accélérer l'incorporation des acides aminés dans les protéines (avec ou sans action sur l'assimilation de l'azote extérieur), soit pour freiner l'ensemble du métabolisme azoté.

Une première manière d'étudier le problème est de faire agir du 2.4.D sur des cultures privées de toute source d'azote extérieur. GORIS (34) avait déjà utilisé une technique analogue pour étudier le métabolisme glucidique de tissus de Carotte sur milieu dépourvu de sucres.

Dans cet esprit, une nouvelle expérience a été conduite de la manière suivante : des cultures âgées de 2 mois ont été repiquées pendant 8 jours sur différents milieux gélosés, tous dépourvus de nitrate : l'action du 2.4.D à 10^{-8} et 10^{-6} a été comparée à celle de l'AIA à 10^{-8} .

L'expérience a confirmé ce qui avait déjà été observé. La teneur en azote aminé soluble, qui était d'environ 23 milligrammes au départ, a augmenté considérablement, pour atteindre 46 milli-

grammes sur le milieu de culture témoin renfermant l'AIA à la concentration habituelle de 10^{-8} . Il y a donc eu, en 8 jours, un gain de 100 p. 100 en azote aminé soluble et l'on peut affirmer que ce gain correspond à l'hydrolyse d'une quantité correspondante de protéines.

TABEAU XVIII

INFLUENCE DU 2.4.D SUR LA COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DE TISSUS CULTIVÉS *in vitro* SUR UN MILIEU DÉPOURVU DE TOUTE SOURCE D'AZOTE

	AIA 10^{-8}	2.4.D	
		10^{-8}	10^{-6}
Azote aminé soluble en mg/100 g de matière fraîche.	46,0	31,7	33,5
Acides aminés solubles en mg/100 g de matière fraîche :			
Acide aspartique.	5,4	2,4	2,9
Acide glutamique.	19,5	9,4	10,4
Glutamine.	11,3	—	3,7
Sérine.	36,2	17,3	30,7
Thréonine.	6,2	—	—
Alanine.	118	85	69
Acide γ -aminobutyrique.	12,3	11	10,4

Le 2.4.D (tabl. XVIII) provoque ici encore une diminution de la teneur en acides aminés solubles, aussi bien à 10^{-8} qu'à 10^{-6} . Elle est du même ordre de grandeur que celle qui a été observée dans les expériences précédentes mais cette fois sa signification est plus claire, puisque l'azote soluble n'est plus en équilibre qu'avec l'azote protéique : dans un tissu privé de toute source d'azote extérieur, il apparaît que le 2.4.D favorise la synthèse des protéines aux dépens de l'azote soluble.

Afin de bien établir ce point, l'expérience a été recommencée non plus avec la souche de GAUTHIERET, mais avec des fragments de racines de Carotte. Compte tenu des observations recueillies sur la teneur en acides aminés des tissus de cette racine, les fragments ont été prélevés de manière à enserrer aussi étroitement que possible la zone cambiale et dans le tiers supérieur de la racine seulement.

Plusieurs carottes de même grosseur ont été utilisées : le poids frais de chaque série est de 15 grammes. L'action du 2.4.D à 10^{-6} et de l'AIA à 10^{-8} a été étudiée en présence et en l'absence de nitrate dans le milieu de culture, sur une période de 8 jours.

TABLEAU XIX

ACTION COMPARÉE DE L'AIA ET DU 2.4.D SUR DES FRAGMENTS DE CAROTTE CULTIVÉS *in vitro*

TENEUR EN AZOTE EXPRIMÉE EN MG /100 G DE MATIÈRE FRAICHE	MILIEU NORMAL AVEC NITRATE		MILIEU SANS NITRATE	
	AIA 10^{-8}	2.4.D 10^{-6}	AIA 10^{-8}	2.4.D 10^{-6}
N aminé soluble	16,3	14,6	13,1	6,6
N total	168	169	93	102

Les résultats, résumés dans le tableau XIX, montrent que dans le cas des ensemencements sur milieux sans nitrate, l'action du 2.4.D est aussi nette que sur la souche anergiée : nous voyons ainsi la teneur en azote aminé soluble passer de 13,1 à 6,6 mg pour 100 grammes de tissus frais, soit une diminution de 50 p. 100. Par contre, les ensemencements pratiqués sur milieux normaux ne répondent au 2.4.D que d'une manière faible et peu significative.

Étude de la fraction protéique insoluble

Nous venons de voir que la signification de la dépression en azote aminé soluble, observée dans toutes les expériences précédentes, était difficile à établir : certes, lorsqu'elle se manifeste dans un tissu transféré sur un milieu privé de toute source d'azote, il est logique de dire qu'elle correspond à un accroissement de la protéosynthèse mais, hors ce cas, l'étude systématique du comportement de la fraction protéique s'impose.

Cette étude a été entreprise sur deux sortes de culture. Les unes, semblables à toutes celles jusqu'ici employées, ont 7 semaines d'âge. Les autres, au contraire, sont des cultures jeunes, beaucoup plus riches en azote, comme nous l'avons déjà observé. Il a paru

TABLEAU XX
CULTURES DE SEPT SEMAINES TRANSPLANTÉES HUIT JOURS SUR UN MILIEU RENFERMANT DES NITRATES

	AIA 10 ⁻³		AIA 10 ⁻⁶		2.4.D 10 ⁻⁴		2.4.D 10 ⁻⁶	
	F. soluble	Protéines	F. soluble	Protéines	F. soluble	Protéines	F. soluble	Protéines
N total								
N soluble	138,2		126		119,3		113,6	
N protéique	26,20		26,15		22,1		16,4	
	85		68,6		67,1		72,5	
Acide aspartique.	10	55,2	11,1	77,3	9,7	68	6,2	78,4
Acide glutamique.	19,8	53,8	18,9	61,1	13,1	56,4	12	60,2
Glutamine.	10,6	—	8	—	7,1	—	4,9	—
Asparagine.	+	—	+	—	+	—	+	—
Sérine.	12,9	33,1	11,1	40,8	10,8	33,5	9,5	37,1
Glycine.	3,9	34,1	3,7	42,6	2,4	34,2	2,8	36,3
Thréonine	4,8	21,8	4,7	25,4	4,7	24,9	3,9	24,7
Alanine	118,7	439	119	51,5	80,4	41,9	60,7	48,4
Acide γ-aminobutyrique.	19	—	8,9	—	12	—	20	—
Valine.	+	40,5	+	37,8	+	36,3	+	44,5
Leucine	*	46,4	*	50,8	*	50,4	*	58,5
Lysine.	—	32,8	—	40,2	—	36,3	—	36,9
Arginine.	30 (1)	87,1 (1)	29,9 (1)	44,5 (1)	11,80	42,5 (1)	8,1	54,9 (1)
Proline	*	15,6	*	17	*	14	*	14,6

N.B.: + acide aminé présent mais non dosé ;
 * acide aminé présent à l'état de traces ;
 — acide aminé non décelé même à l'état de traces ;
 (1) dosée par la méthode de Mac Pherson.

intéressant, en effet, de comparer la réaction d'un tissu normal, adulte, à celle d'un tissu jeune, analogue à un méristème.

I. — CULTURES AGÉES DE 7 SEMAINES

Mode opératoire. — Ces cultures sont transférées sur un milieu nutritif gélosé contenant des nitrates à la dose habituelle et la substance de croissance, AIA ou 2.4.D à 10^{-8} ou 10^{-6} .

Au bout de 7 jours de culture, les tissus sont extraits des tubes et pesés, puis la séparation et l'analyse de la fraction protéique sont menées suivant la technique décrite au chapitre n° I.

Résultats. — Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau XX.

Les dosages d'azote protéique font apparaître combien la comparaison entre les deux substances de croissance doit être nuancée. Dans le domaine des concentrations étudiées, la teneur en azote protéique décroît quand la concentration en AIA croît, tandis qu'elle varie dans le même sens que la concentration en 2.4.D.

Si l'on compare l'action des deux substances à la concentration de 10^{-8} , il faut conclure à une nette action déprimante du 2.4.D sur la protéosynthèse, puisque l'azote protéique passe de 85 milligrammes pour 100 grammes de tissus frais pour l'AIA à 67,4 mg pour le 2.4.D. Toutefois, à la concentration de 10^{-6} , c'est l'inverse qui se produit et nous constatons au contraire une légère stimulation de la synthèse des protéines.

L'analyse de la fraction protéique montre que l'ensemble des acides aminés évolue comme l'azote protéique, sauf dans le cas du premier extrait, nettement plus riche que les autres en azote protéique mais légèrement moins riche en acides aspartique et glutamique, etc.

La fraction soluble évolue d'une manière analogue à celle que nous avons déjà décrite à plusieurs reprises : notons la forte diminution de la teneur en arginine et, en sens opposé, l'augmentation de la teneur en acide γ -aminobutyrique, en présence de 2.4.D à la concentration de 10^{-6} .

TABLEAU XXI

CULTURES AGÉES DE TROIS SEMAINES TRANSPLANTÉES HUIT JOURS SUR MILIEUX RENFERMANT DES NITRATES

	AIA 10^{-8}		AIA 10^{-6}		2.4.D 10^{-8}		2.4.D 10^{-6}	
	F. soluble	Protéines	F. soluble	Protéines	F. soluble	Protéines	F. soluble	Protéines
N total	235		235,5		219,5		218	
N soluble	76,5		72,8		58,4		57,7	
N protéique	119		98,1		96,1		128,5	
N nitrique	23,1		17,1		15,5		12,1	
Acide aspartique.	55	87,5	55,2	100,2	29,6	94,9	18,9	115
Acide glutamique.	54,2	109,5	60	90,5	43,9	101,5	3,6	120,5
Glutamine.	39	—	25,7	—	12,5	—	7,9	—
Asparagine.	—	—	—	—	—	—	—	—
Sérine.	32,3	48,3	33,3	44	23,2	53,2	19,6	56,5
Glycine.	5,0	46,3	4,9	45	3,7	42,5	3,9	55,7
Thréonine.	11,7	37,7	12,1	32,4	8,1	35,4	7,9	40,5
Alanine.	177,5	55,4	175,7	42,4	128,7	48,2	115	55,1
Acide γ -aminobutyrique.	22,8	*	22	*	15,4	*	18,3	*
Valine.	14,6	67,2	13,5	23,7	127	57,3	12,5	71,2
Leucine.	—	—	—	—	—	—	—	—
Lysine.	—	52	—	36,7	—	—	—	—
Arginine.	10,1	55,2	8,8	41,1	6,4	43,5	9,9	46,5
Proline.	*	8,7	*	11,5	*	54,2	*	51,2
								66,8

N.B.: + acide aminé présent mais non dosé ;

* acide aminé présent à l'état de traces ;

— acide aminé non décelé même à l'état de traces.

II. — CULTURES AGÉES DE 3 SEMAINES

Les résultats de cette expérience figurent dans le tableau XXI et font apparaître en premier lieu la grande richesse de toutes les fractions azotées étudiées, ce qui confirme les résultats antérieurs.

Les variations de chaque élément se présentent de la même manière que dans le cas des cultures âgées de 7 semaines :

— L'azote protéique diminue quand la concentration en AIA croît, augmente au contraire avec celle du 2.4.D. Le phénomène est ici encore plus marqué, puisque c'est avec le 2.4.D à 10^{-6} que la teneur en azote protéique est la plus élevée des quatre tissus extraits.

— L'azote soluble diminue progressivement quand on passe des tissus cultivés en présence d'AIA à la concentration 10^{-8} à ceux qui ont proliféré en présence de 2.4.D à la concentration 10^{-6} . Ceci est une confirmation des résultats précédents.

— De même, la teneur en azote nitrique est de plus en plus faible.

— L'analyse de la fraction protéique fait ressortir des différences plus importantes entre l'action du 2.4.D et celle de l'AIA. Le 2.4.D. semble avoir un effet particulièrement marqué sur la teneur des protéines en proline, six fois plus élevée ici que là. La répartition des autres amino-acides est par ailleurs sensiblement la même ; il convient de noter cependant que les acides aspartique et glutamique sont plus abondants dans les cultures sur 2.4.D.

III. — CONCLUSION

La similitude de réaction des tissus jeunes et des tissus adultes mérite d'être soulignée et donne une valeur plus générale aux conclusions que l'on peut tirer de ces deux séries d'expériences.

Le premier fait marquant, celui qui donne son sens à l'appauvrissement en azote soluble observé depuis le début de ce travail, est que le 2.4.D provoque toujours une diminution de la teneur en azote total. Déjà, après 4 jours de transplantation, un résultat analogue avait été observé.

De même, les dosages d'azote nitrique font apparaître une nette diminution, proportionnelle à la dose de 2.4.D.

La conclusion à tirer de ces deux faits serait donc que l'ensemble de l'assimilation azotée se trouve freinée sous l'action du 2.4.D. Déjà une forte dose d'AIA ralentit cette assimilation mais le fait est de beaucoup plus sensible avec la plus forte dose de 2.4.D.

Par contre, la synthèse des protéines n'est pas ralentie par le 2.4.D puisque, au contraire, c'est avec le 2.4.D à 10^{-6} qu'on observe la plus grande teneur en azote protéique dans les cultures de 3 semaines.

En résumé, le 2.4.D semble donc freiner l'assimilation totale de l'azote mais augmenter la part de l'azote protéique dans l'azote total : moins riche en azote aminé soluble, plus riche en protéines. tel se présente un tissu cultivé au contact du 2.4.D.

Chapitre III

ÉTUDE DE L'INCORPORATION D'ACIDES AMINÉS MARQUÉS AU ^{14}C DANS LES TISSUS CULTIVÉS EN PRÉSENCE DE 2.4.D OU D'AIA

Nous avons étudié, jusqu'à maintenant, l'action du 2.4.D sur des tissus placés dans des conditions de nutrition azotée normales, c'est-à-dire des tissus qui ont d'abord à puiser l'azote nitrique dans le milieu extérieur puis à le réduire en nitrite et en azote ammoniacal avant de l'utiliser pour la synthèse de leurs protéines.

On peut supposer que le freinage du métabolisme azoté, tel qu'il vient d'être mis en évidence, est en relation avec une action spécifique du 2.4.D sur l'assimilation de l'azote minéral. Déjà, LUEKE (47), HAMMER et SELL ont montré que des plantes traitées par cet herbicide étaient nettement déficientes en pyridine-nucléotides dont on connaît le rôle dans la réduction des nitrates.

Nous avons pensé, dans ces conditions, qu'il serait intéressant de préciser le sens de l'action du 2.4.D par l'étude du comportement des tissus de Carotte sur des milieux dont l'azote serait d'origine organique et fourni exclusivement par un acide aminé. L'expérience consisterait alors à voir si le 2.4.D modifie le rythme d'utilisation de cet amino-acide et si, d'un point de vue qualitatif, les étapes de son métabolisme sont les mêmes.

Parmi les amino-acides dont nous avons reconnu la présence dans les protéines des tissus de Carotte, nous avons choisi la glycine, l'acide glutamique et l'arginine pour en étudier le métabolisme à raison de leur importance et, dans chaque cas, l'emploi de molécules marquées au ^{14}C nous a permis de suivre les étapes de la transformation de l'acide aminé dans les tissus ainsi que d'en apprécier le rythme.

Mais l'utilisation des acides aminés comme sources uniques d'azote pose un problème. Nous savons en effet que ces substances,

à concentration suffisamment forte, ne sont pas dénuées de toxicité pour les tissus végétaux. RIKER et GUTSCHE (73) ont montré en particulier que, sur un milieu contenant de la glycine 0,064 M la croissance des tissus de Crown-gall d'*Helianthus annuus* ne représentait que 50 p. 100 de celle du témoin au bout de 6 semaines de culture ; sur arginine 0,016 M l'augmentation de poids frais n'était que de 25 p. 100 de l'augmentation de poids du témoin.

Aussi nous n'avons employé, dans les expériences suivantes que des concentrations beaucoup plus faibles que ces auteurs (glycine 0,008 M et arginine 0,004 M) et pendant un laps de temps plus bref (1 semaine au maximum). Quant à l'acide glutamique, FRANK, RIKER et DYE ont montré dans une étude plus récente (29) qu'il était au contraire un élément favorable pour la croissance de ces mêmes tissus d'*Helianthus annuus*.

Métabolisme de la glycine 2-¹⁴C

La facilité avec laquelle la glycine 2-¹⁴C est assimilée par les feuilles de Soja a été signalée par RACUSEN (69) qui a montré la part importante de la radioactivité initiale que l'on retrouve au niveau des protéines et de l'amidon.

Il s'agit de suivre le devenir de cet acide dans les tissus de Carotte et d'essayer de mettre en évidence soit une altération de son métabolisme sous l'effet du 2.4.D, soit une modification de son rythme d'utilisation.

MODE OPÉRATOIRE. — L'expérience consiste à transplanter des colonies de tissus de Carotte âgées de 7 semaines sur un milieu liquide comportant comme source unique d'azote de la glycine 8 mM et une dose traceuse de glycine 2-¹⁴C.

Ce milieu a la composition globale suivante (pour 1 l d'eau) :

SO ₄ Mg, 7H ₂ O	0,125 g
PO ₄ H ₂ K	0,125 g
Glucose	30 g
Glycine	0,600 g
Vitamine B ₁	0,001 g
AIA ou 2.4.D.	
Solution de Berthelot modifiée	10 gouttes

Quelle que soit la facilité avec laquelle ces tissus assimilent la glycine, le milieu ainsi réalisé n'est donc pas à même d'assurer une culture indéfinie car il est dépourvu de calcium. Cependant, pour des expériences dont la durée n'excède pas 7 jours, les carences ne sont pas à craindre.

Les essais précédents ont montré que c'est à la concentration de 10^{-6} que le 2.4.D produisait son effet le plus caractéristique sur l'équilibre entre les fractions azote soluble et azote protéique : c'est à cette dose qu'il est ici comparé à l'AIA 10^{-8} , concentration physiologique qui assure une croissance normale des tissus de Carotte.

Un premier lot de colonies tissulaires est extrait des fioles 2 jours après et un deuxième 7 jours après le début de l'expérience. Chaque lot se compose de 6 colonies, soit au total environ 15 à 18 grammes de matière fraîche. Lors de l'extraction, les tissus sont séchés entre deux feuilles de papier-filtre, placés sur une feuille de polythène tarée, pesés, puis fixés dans l'éthanol bouillant. Les acides aminés libérés et les protéines sont séparés et analysés selon la méthode habituelle.

Les mesures de radioactivité sont réalisées sur chacun des extraits (fraction soluble et hydrolysât de protéine purifié) selon les techniques décrites au chapitre des techniques d'analyse.

L'analyse des extraits comporte, outre l'étude quantitative habituelle, l'autoradiographie d'un chromatogramme obtenu à partir d'une tache initiale importante (60 mm^3).

RÉSULTATS :

Après 2 jours de culture. — Nous examinerons successivement les renseignements donnés par les dosages pondéraux puis par les mesures de radioactivité et l'autoradiographie.

Les tableaux XXII et XXIII montrent que le 2.4.D a, ici encore, pour effet une diminution de la teneur en azote soluble tandis que les protéines sont en très légère augmentation. L'analyse de la fraction soluble indique qu'en présence du 2.4.D tous les acides aminés sont moins abondants ou au plus égaux, à une exception près, celle de la glycine. Cet acide est, en effet, plus abondant dans les tissus mis au contact de l'herbicide et il est de beaucoup plus

important que dans les tissus cultivés sur un milieu normal, comportant des nitrates. Un autre fait caractéristique est la très grande richesse en sérine, qui paraît liée à l'assimilation de la glycine.

La radioactivité de la fraction aminée soluble est considérable et plus forte encore avec le 2.4.D à la concentration de 10^{-6} qu'avec le témoin à l'AIA. Ainsi qu'on pouvait s'y attendre, il y a encore relativement peu de ^{14}C incorporé dans les protéines. Mais là, par contre le 2.4.D entraîne une diminution légère de l'activité spécifique (tabl. XXIV).

TABLEAU XXII

TENEUR EN AZOTE DES TISSUS DE CAROTTE CULTIVÉS SUR GLYCINE

TEMPS DE CULTURE	DEUX JOURS		SEPT JOURS	
	AIA 10^{-8}	2.4.D 10^{-6}	AIA 10^{-8}	2.4.D 10^{-6}
N soluble mg /100 g MF. . .	44,3	32,8	33,1	32,7
N protéique mg /100 g MF. .	57,7	61,5	66	71
N soluble + N protéique. . .	102	94,3	99,4	106,7

Les autoradiogrammes montrent (pl. I, II, III) :

a) *Dans la fraction libre, en présence d'AIA* une très importante radioactivité au niveau de la glycine et de la sérine. La cystéine est également marquée ainsi que, plus faiblement, l'acide glutamique, la glutamine et l'alanine. Sur les clichés originaux, on peut observer une très légère trace radioactive au niveau de l'arginine et de l'acide γ -aminobutyrique.

En présence de 2.4.D on observe que la radioactivité de l'arginine est notablement plus forte.

b) *Dans les protéines, en présence d'AIA* une fixation importante de ^{14}C sur la sérine, la glycine et la cystéine. De très faibles taches sont visibles sur l'autoradiogramme au niveau de l'arginine, la valine, la leucine, des acides aspartique et glutamique, de l'alanine, la thréonine et la proline.

En présence de 2.4.D le marquage des amino-acides est identique.

Après 7 jours de culture. — Voir tableaux XXII et XXIV.

TABLEAU XXIII

TENEUR EN ACIDES AMINÉS DES TISSUS DE CAROTTE CULTIVÉS SUR GLYCINE DEPUIS DEUX JOURS

ACIDES EN mg/100 g MATIÈRE FRAICHE	AIA 10 ⁻⁸		2.4.D 10 ⁻⁶	
	Fraction soluble	Protéines	Fraction soluble	Protéines
Acide aspartique	8,3	58,9	3,2	61,2
Acide glutamique	20,5	66	8,9	61,3
Asparagine	—	+	+	—
Glutamine	11,1	—	*	—
Sérine	76,8	51,5	78,4	55,7
Glycine	18,4	24,9	27,7	29,5
Thréonine	*	17,3	*	20,3
Alanine	100	19,3	76	23,6
Acide γ -aminobutyrique	12,9	—	*	—
Valine	*	20,5	*	27,3
Leucine	*	+	*	+
Lysine	—	14,5	—	17,5
Arginine	—	17,1	—	20,4
Proline	*	+	*	+

N.B.: + acide aminé présent en quantité notable, mais non dosé ;
 * acide aminé présent à l'état de traces ;
 — acide aminé non repéré même à l'état de traces.

Les dosages d'azote font ressortir une plus grande teneur en protéines qu'au 2^e jour et la stimulation de cette protéosynthèse par le 2.4.D. Par ailleurs, comme il est normal, ces tissus ont accumulé davantage de carbone marqué, principalement dans les protéines. Mais ici, aussi bien dans la fraction soluble que dans les protéines, le 2.4.D entraîne une diminution de l'activité fixée.

L'autoradiographie confirme les résultats obtenus précédemment.

TABLEAU XXIV.

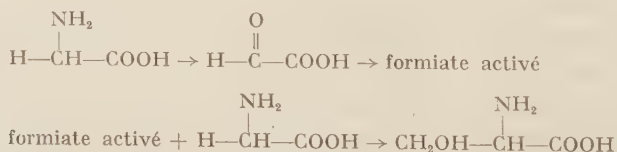
RADIOACTIVITÉ DES TISSUS CULTIVÉS SUR GLYCINE 2-¹⁴C EXPRIMÉE
EN CP/MIN PAR GRAMME DE MATIÈRE FRAICHE

	DEUX JOURS		SEPT JOURS	
	AIA 10 ⁻⁸	2.4.D 10 ⁻⁶	AIA 10 ⁻⁸	2.4.D 10 ⁻⁶
Fraction soluble	31 800	38 930	40 800	38 650
Protéines	13 820	11 870	18 150	19 800

Activité mesurée avec un compteur TRACERLAB muni
d'une fenêtre de 1,8 mg/cm²

CONCLUSIONS. — La réaction la plus importante à laquelle participe la glycine au cours de son assimilation par les tissus est sa rapide transformation en sérine. Dès le 2^e jour, en effet, nous avons remarqué combien était grande la teneur en sérine libre. Sa radioactivité est très importante et, sur les autoradiogrammes, la tache de sérine est plus marquée que celle de glycine. Dès le 2^e jour également, sérine et glycine se retrouvent marquées dans les protéines. De même la cystéine marquée apparaît rapidement dans la fraction soluble et dans l'insoluble.

RACUSEN (69) a déjà observé cette transformation de la glycine en sérine dans les feuilles de Soja et, d'après ABELSON (1), la réaction existe aussi dans *Escherichia Coli* mais en sens inverse. D'après plusieurs travaux réalisés à l'aide d'enzymes provenant de tissus animaux, la suite des réactions pourrait être la suivante (34) :



En ce qui concerne la manière dont le 2.4.D intervient dans l'assimilation de la glycine, soulignons tout d'abord que, dans les tissus cultivés en sa présence, l'activité spécifique de l'arginine libre est, d'après l'autoradiographie, plus importante que dans les

tissus cultivés en présence d'AIA à la concentration de 10^{-8} . Pour le reste, la composition de la fraction soluble et de la fraction protéique est peu modifiée.

La mesure de la radioactivité globale de la fraction protéique permet d'avoir une estimation de la vitesse d'intégration du ^{14}C dans les protéines ; ce n'est pas une mesure exacte du phénomène, car il n'est pas certain que les protéines formées *de novo* à partir de cette glycine ou de cette sérine radioactive n'aient pas eu le temps de se dégrader à nouveau, donnant naissance par exemple à du $^{14}\text{CO}_2$: la radioactivité d'une fraction, mesurée au temps t , ne correspond qu'à la différence entre la somme des activités reçues et la somme des activités cédées à l'extérieur.

Ces mesures semblent indiquer qu'au début de la mise en culture, le 2.4.D favorise l'absorption des acides aminés et, par contre, retarde leur incorporation dans la fraction protéique. Après 7 jours de culture, au contraire, nous retrouvons moins de radioactivité dans la fraction soluble et légèrement plus dans les protéines.

A cette première image de l'action du 2.4.D, il faut ajouter que les dosages pondéraux montrent une fois encore l'action favorisante sur la synthèse des protéines.

Métabolisme de l'acide glutamique 3-4-di ^{14}C

Dans le même esprit que précédemment, il a paru intéressant d'étudier la manière dont le 2.4.D peut affecter l'assimilation de l'acide glutamique quand celui-ci représente la seule source d'azote mise à la disposition des tissus cultivés *in vitro*.

MODE OPÉRATOIRE. — Cette expérience est semblable en tous points à la précédente. L'acide glutamique est présent dans les milieux, à la concentration de 8 m M et l'acide marqué au ^{14}C est fourni à raison de 10^{-6} cp/min pour 100 ml de milieu.

Un premier lot de colonies tissulaires est prélevé au 2^e jour de la culture, l'autre au 7^e jour.

TABLEAU XXV

TENEUR EN AZOTE DES TISSUS DE CAROTTE CULTIVÉS
SUR ACIDE GLUTAMIQUE

TEMPS DE CULTURE	DEUX JOURS		SEPT JOURS	
	AIA 10 ⁻⁸	2.4.D 10 ⁻⁶	AIA 10 ⁻⁸	2.4.D 10 ⁻⁶
N soluble en mg/100 g MF .	33,2	24,8	35,6	25,9
N protéique en mg/100 g MF .	59,9	63,7	67,1	77,4
N soluble + N protéique. . .	93,1	88,5	103	103,3

TABLEAU XXVI

TENEUR EN ACIDES AMINÉS DES TISSUS DE CAROTTE
CULTIVÉS SUR ACIDE GLUTAMIQUE DEPUIS DEUX JOURS

ACIDES AMINÉS EN mg/100 g MF	AIA 10 ⁻⁸		2.4.D 10 ⁻⁶	
	Fraction soluble	Protéines	Fraction soluble	Protéines
Acide aspartique	4,4	58,5	4,4	57,8
Acide glutamique	25,6	58,5	23,6	62,1
Asparagine	—	—	—	—
Glutamine	8,5	—	6,4	—
Sérine	8,5	21,7	6,7	24,6
Glycine	3,8	19,9	4,0	28,9
Thréonine	5,3	11,5	4,7	17,7
Alanine	104	13,7	61,6	28
Acide γ-aminobutyrique . . .	133	*	122	*
Valine	*	+	*	15,1
Leucine	*	14,9	*	53,4
Lysine	—	11,2	—	31,2
Arginine	—	43,8 (1)	—	41,9 (1)
Proline	—	—	—	—
Tyrosine	—	—	—	—

N.B.: + acide aminé présent en quantité notable, mais non dosé ;
 * acide aminé présent à l'état de traces ;
 — acide aminé non repéré même à l'état de traces ;
 (1) arginine dosée par la méthode de Mac Pherson.

RÉSULTATS :

Après 2 jours de culture (tableaux XXV, XXVI, XXVII). — Les dosages d'azote soluble et d'azote protéique donnent des résultats comparables à ceux obtenus en culture normale sur milieu renfermant des nitrates : la teneur en azote soluble est moindre en présence de 2.4.D, la teneur en azote protéique supérieure mais la somme des deux reste inférieure à ce qu'elle est en présence d'AIA.

TABLEAU XXVII

RADIOACTIVITÉ DES TISSUS CULTIVÉS SUR ACIDE GLUTAMIQUE 3-4-DI ¹⁴C
EXPRIMÉE EN CP/MIN PAR GRAMME DE MATIÈRE FRAICHE

	DEUX JOURS		SEPT JOURS	
	AIA 10 ⁻⁸	2.4.D 10 ⁻⁶	AIA 10 ⁻⁸	2.4.D 10 ⁻⁶
Fraction soluble	11 530	6 800	14 620	11 440
Protéines	4 495	4 715	6 510	6 450

Activité mesurée avec un compteur TRACERLAB muni d'une fenêtre de 1,8 mg/cm²

L'analyse de la fraction soluble fait ressortir un fait nouveau par rapport à l'expérience réalisée avec la glycine : cette fois, la teneur en tous les acides est diminuée par le 2.4.D même celle d'acide glutamique, qui reste d'ailleurs à un niveau sensiblement égal à ce qu'elle est dans une culture normale. Le fait le plus remarquable est la très forte accumulation d'acide γ -aminobutyrique qui provient de la métabolisation de l'acide glutamique.

Dans les protéines, on observe peu de différences pour les acides aspartique, glutamique et la sérine. Par contre, on note une forte augmentation des teneurs en thérionine, alanine, valine et surtout leucine et lysine.

Les mesures de radioactivité (tabl. XXVII) confirment les résultats des dosages d'azote : en présence de 2.4.D la fraction soluble est nettement moins radioactive et les protéines légèrement plus riches en ¹⁴C.

L'autoradiographie (pl. IV et V) montre le marquage rapide de l'acide γ -aminobutyrique. Un grand nombre d'autres acides sont

marqués mais à un degré bien moindre. Ce sont l'acide aspartique, l'asparagine, la glutamine, la sérine, la glycine, la valine, la thréonine et l'alanine.

Dans les protéines, le marquage des acides est tout à fait différent. Les acides les plus radioactifs sont l'acide glutamique mais aussi l'acide aspartique. Sont également porteurs de ^{14}C , bien que non marqués dans la fraction soluble, la proline, l'hydroxyproline, et l'arginine. On voit aussi une fixation de ^{14}C au niveau de la lysine, de la thréonine et de l'alanine.

Au 7^e jour. — Les dosages montrent que les tissus mis au contact du 2.4.D sont plus riches en azote protéique mais plus pauvres en azote soluble.

La radioactivité des protéines n'est pas cependant sensiblement différente, avec le 2.4.D ou avec l'AIA.

CONCLUSION. — La décarboxylation de l'acide glutamique en acide γ -aminobutyrique dans les tissus végétaux a été mise en évidence par plusieurs auteurs (16, 46 *bis*). Elle paraît ici particulièrement importante puisque sur l'autoradiogramme on peut voir une plus forte activité au niveau de ce dernier qu'au niveau de l'acide glutamique. Son accumulation dans la fraction libre (133 mg au lieu de 19 mg dans un tissu normal) semble indiquer qu'il constitue, pour l'azote soluble, une forme de réserve difficilement utilisable ultérieurement pour la synthèse des protéines.

Il est intéressant de noter que plusieurs acides aminés non marqués à l'état libre deviennent radioactifs une fois engagés dans les protéines : c'est le cas, en particulier, de la proline et de l'arginine, dont la genèse, à partir de l'acide glutamique, en passant par l'intermédiaire de la semialdéhyde glutamique, est bien connue.

Ici, le 2.4.D ne paraît pas avoir altéré le métabolisme normal de l'acide glutamique et les seules différences relevées sont d'ordre quantitatif : comme précédemment, avec la glycine $2\text{-}^{14}\text{C}$, la somme des teneurs en ^{14}C des protéines et de la fraction soluble est plus faible dans les tissus mis au contact de l'herbicide. Mais il n'est pas certain que ceci ne corresponde pas à une dégradation accélérée de l'acide glutamique plutôt qu'à un ralentissement de son absorption.

Métabolisme de l'arginine
uniformément marquée par le ^{14}C

L'arginine joue un rôle particulièrement important dans le métabolisme azoté des végétaux. Divers auteurs ont montré qu'elle s'accumule dans certains tissus, soit quand la synthèse des protéines est bloquée, par suite d'une carence en Soufre et en Fer, soit, plus naturellement, dans les tissus de réserve, comme le bulbe de Tulipe ou le tubercule de Topinambour, à la fin de la phase de végétation active.

DURANTON (21) a montré récemment, à l'aide de ce dernier matériel, la rapidité avec laquelle l'arginine évolue dans les tissus cultivés *in vitro* en présence d'auxine et comment elle se transforme en proline, hydroxyproline, en acide glutamique, en amides et en alanine. *In vivo*, l'arginine libre disparaît très rapidement dès la reprise de la végétation, à la fin de l'hiver, au moment où, comme l'avait montré KULESCHA (42), la teneur en auxine des tissus de Topinambour augmente. Il est logique de penser que, dans l'un et l'autre cas, sous l'action de l'auxine, l'arginine disparue de la fraction azotée soluble a été utilisée pour la synthèse de nouvelles protéines.

Nous avons essayé de voir si, de la même manière, l'arginine participait activement à la protéosynthèse dans les tissus de Carotte cultivés *in vitro* et dans quelle mesure le 2.4.D influait sur cette participation.

A la différence des expériences précédentes, nous avons suivi l'incorporation du ^{14}C de la molécule d'arginine dans le gaz carbonique rejeté dans les acides organiques, dans la fraction neutre, en même temps que dans les acides aminés libres et dans les protéines : nous avons pu, de ce fait, dresser un bilan complet de la répartition de la radioactivité incorporée.

MODE OPÉRATOIRE. — Les tissus de Carotte ont été cultivés pendant 48 heures sur milieux liquides dans des fioles munies d'un absorbeur à gaz carbonique (fig. 1).

Les milieux ont la composition suivante :

Cl ₂ Ca, 2H ₂ O.	0,500 g
SO ₄ Mg, 7H ₂ O	0,125 g
ClK.	0,125 g
PO ₄ H ₂ K.	0,125 g
Glucose.	30 g
Vitamine B ₁	0,001 g
Arginine.	0,696 g

Ils contiennent, en outre, soit de l'AIA 10⁻⁸, soit du 2.4.D à la concentration de 10⁻⁶.

TABLEAU XXVIII

ASSIMILATION DU ¹⁴C DE L'ARGININE DANS LES TISSUS DE CAROTTE
AU BOUT DE DEUX JOURS

	AIA 10 ⁻⁸		2.4.D 10 ⁻⁶	
	Activité totale en cp/min pour 19 701 g MF	Activité par g MF	Activité totale en cp/min pour 23 995 g MF	Activité par g MF
CO ₂	438 750	21 767	412 750	17 252
Fraction neutre non retenue par les échangeurs d'ions	41 250	2 095	40 000	1 665
Acides organiques.	65 800	3 315	62 500	2 605
Acides aminés	1 215 600	61 600	1 272 800	53 100
Protéines (hydrolysats).	446 500	22 700	452 000	18 850
Activité résiduelle du milieu de culture.	2 920 000		2 710 000	
Total	5 127 900	114 507	4 950 050	93 472
Activité initiale.	6 122 000		6 122 000	
Activité retrouvée % activité initiale	84		81	

• A la fin de l'expérience, les tissus ont été congelés dans l'azote liquide, broyés en présence d'eau à 0° C, puis traités par une résine échangeuse de cations et une résine échangeuse d'anions, comme nous l'avons vu dans la description du mode d'extraction des acides organiques.

La radioactivité du CO₂ rejeté a été déterminée par précipitation du ¹⁴CO₃Na₂ à l'état de ¹⁴CO₃Ba. La radioactivité des milieux de culture a été mesurée avant et après l'expérience ; de plus, ces

milieux ont été analysés par chromatographie sur papier, en fin d'expérience, pour voir s'ils comportaient d'autres acides aminés que l'arginine.

TABEAU XXIX

TENEUR EN AZOTE ET EN ACIDES AMINÉS DES TISSUS DE CAROTTE CULTIVÉS SUR ARGININE DEPUIS DEUX JOURS

	AIA 10 ⁻⁸		2.4.D 10 ⁻⁶	
	Fraction soluble	Protéines	Fraction soluble	Protéines
Azote en mg/100 g MF	36,9	94,4	32,7	86,8
Acides aminés en mg/100 g MF :				
Acide aspartique . . .	6,5	76	4,8	79,2
Acide glutamique . . .	17	87,1	10,9	66,6
Asparagine	+	—	+	—
Glutamine	11,3	—	7,2	—
Sérine	8,4	36,8	6,7	38
Glycine	3,2	65	2,1	36,1
Thréonine	2,7	47,1	2,8	22,5
Alanine	95,6	66,9	73,8	58,1
Acide γ -aminobutyrique	14,3	—	6,5	—
Valine	*	51,1	*	13,2
Leucine	*	—	*	—
Lysine	—	36,6	—	31,2
Arginine (1)	53,1	72,3	19,5	45,4
Citrulline	9,1	—	7,7	—
Ornithine	*	—	*	—
Proline (2)	*	13,6	*	38,6
Hydroxypoline	—	*	—	*
Tyrosine	—	*	—	*

N.B. : + acide aminé en quantité notable mais non dosé ;
 * acide aminé présent à l'état de trace ;
 — acide aminé non repéré à l'état de trace ;
 (1) dosée par la méthode de Mac Pherson ;
 (2) dosée par la méthode de Chinard.

RÉSULTATS. — Nous examinerons successivement le comportement des acides organiques, des acides aminés libres, des protéines, puis des milieux de culture, avant d'établir le bilan de la radioactivité incorporée dans les tissus.

1^o *Acides organiques.* — Les courbes des figures 20 et 21 font

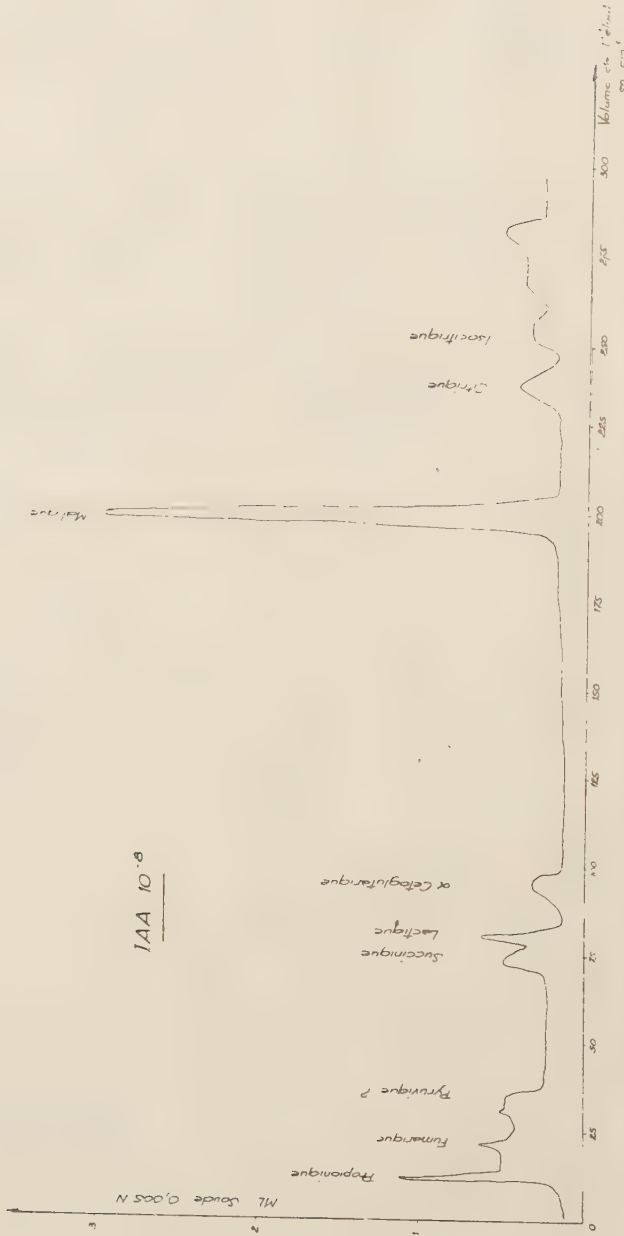


Fig. 20. — Composition en acides organiques de la souche de Carotte cultivée deux jours in vitro en présence d'IAA à la concentration de 10^{-8}) sur un milieu sans autre source d'azote que l'arginine.

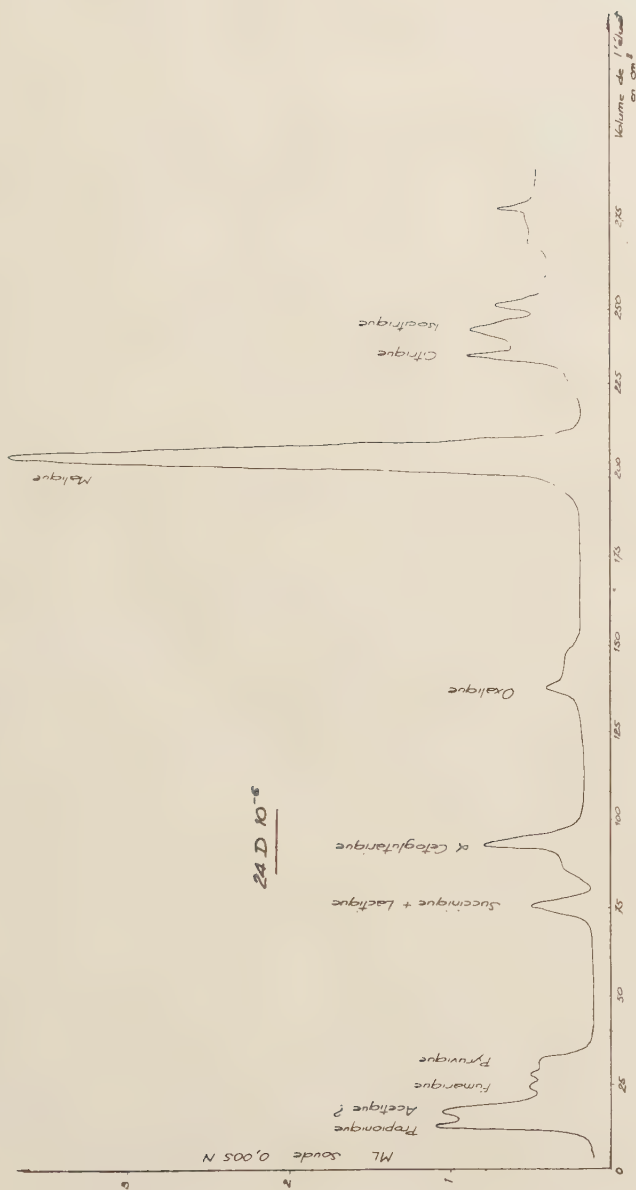


FIG. 21. — Composition en acides organiques de la souche de Carotte cultivée deux jours in vitro en présence de 2.4.D à la concentration de 10⁻⁶ sur un milieu sans autre source d'azote que l'arginine.

ressortir la prédominance de l'acide malique sur l'ensemble des autres acides organiques. De faibles quantités d'acides propionique, fumarique, succinique, α -cétoglutarique et citrique sont également mises en évidence.

Les tissus cultivés en présence de 2.4.D ne présentent pas de différence appréciable au point de vue qualitatif ni quantitatif : les ordonnées des pics relevés sur les courbes sont plus grandes pour les cultures sur 2.4.D. mais c'est parce qu'elles proviennent d'un plus grand poids de tissus frais (23,995 g au lieu de 19,701 g).

L'ensemble de ces acides organiques n'est que très faiblement radioactif : nous ne trouvons que 3 345 coups-minute par gramme de tissus frais en présence d'AIA à la concentration de 10^{-8} contre par exemple 22 700 coups-minute dans les protéines et 24 767 coups-minute dans le CO_2 rejeté.

2° *Acides aminés libres.* — Le tableau XXIX montre une nouvelle fois une diminution de la teneur en azote aminé soluble sous l'action du 2.4.D Cette action est cependant plus discrète qu'en présence de l'acide glutamique ou de la glycine.

Parmi ces acides aminés, on trouve évidemment une forte concentration en arginine mais aussi une quantité non négligeable de citrulline. Cette substance a été caractérisé sans ambiguïté par ses R_f ainsi que par la réaction jaune qu'elle donnait avec la p.-diméthylaminobenzoaldéhyde à 1 p. 100 dans l'acide chlorhydrique 1 N. De même, une tache allongée, voisine sur nos chromatogrammes de l'asparagine, a pu être identifiée comme étant de l'ornithine. Pour cela, nous avons surchargé le chromatogramme de l'extrait avec une forte quantité d'ornithine et nous avons constaté que la tache témoin recouvrait la tache inconnue (pl. VII).

L'analyse comparée des deux cultures indique une légère diminution de l'ensemble des teneurs en acides aminés libres sous l'effet du 2.4.D.

L'autoradiographie (pl. VI) donne des renseignements intéressants sur l'évolution de la molécule d'arginine : la plus grande partie de la radioactivité se retrouve dans l'arginine mais de plus la citrulline et l'ornithine sont-elles aussi nettement marquées. De même, la proline et l'hydroxyproline, non visibles sur le chromato-

gramme, laissent cependant une trace radioactive sur l'autoradiogramme. L'acide glutamique, la glutamine, l'alanine et l'acide γ -aminobutyrique ont incorporé du carbone radioactif. Enfin, nous avons observé une assez importante activité au niveau d'une tache non révélée par la ninhydrine mais donnant la réaction de SAKAGUCHI, que nous avons identifiée à l'acide guanidobutyrique grâce à son R_f.

L'ensemble de ces résultats n'est pas modifié par le 2.4.D.

3° *Protéines*. — Les tissus qui ont été cultivés en présence de 2.4.D apparaissent légèrement moins riches en protéines que les tissus témoins (tabl. XXIX) ; leur teneur en azote est de 86,8 mg pour 100 grammes de tissus frais contre 94,4 mg.

L'analyse chromatographique de ces protéines les montre assez semblables et, en présence de 2.4.D, c'est l'ensemble des amino-acides engagés qui accuse une légère diminution. La teneur en arginine des tissus témoins atteint 72,3 mg, soit sensiblement plus que celle des témoins cultivés sur acide glutamique (43,8 mg) et, de la même manière, la teneur en proline est élevée (pl. VIII).

L'autoradiographie de ces protéines hydrolysées montre bien la différence qui sépare les compositions en amino-acides de la fraction soluble et de la fraction insoluble. Ainsi la proline présente à l'état de trace radioactive dans la fraction soluble devient aussi fortement marquée que l'arginine dans la fraction protéique. De même, l'acide aspartique engagé dans les protéines est aussi radioactif que l'acide glutamique alors qu'il l'était beaucoup moins dans la fraction soluble.

Ici encore, les résultats sont qualitativement les mêmes en présence de 2.4.D et d'AIA.

4° *Milieux de culture*. — Il a paru intéressant de rechercher si l'arginine constituait toujours le seul acide aminé présent dans les milieux de culture en fin d'expérience. Pour cela, les deux milieux ont été parallèlement traités par la Permutite 50, de même manière que les broyats de tissus.

Au cours de la culture, aussi bien sur l'AIA que sur le 2.4.D nous voyons apparaître, à côté de l'arginine, les produits de son méta-

bolisme : citrulline et ornithine, à des concentrations non négligeables. De plus, un ensemble d'autres acides sont représentés à l'état de traces : acides glutamique et aspartique, sérine, glycine, thréonine et alanine.

Les autoradiogrammes (pl. IX) montrent, dans les deux cas, que la citrulline et surtout l'ornithine sont radioactives. On décèle, de même que dans la fraction aminée soluble, la présence d'acide guanidobutyrique.

5° *Bilan de la radioactivité incorporée dans les tissus.* — Le tableau XXVIII donne le bilan de la radioactivité incorporée dans les tissus de Carotte.

a) *En présence d'AIA* nous constatons tout d'abord que l'arginine est utilisée à un rythme rapide : 48 heures après le début de l'expérience, il ne reste que 2 900 000 coups-minute dans le milieu de culture, contre 6 122 000 coups-minute au moment de l'ensemencement.

Cette molécule d'arginine, rapidement absorbée dans les tissus, paraît subir une dégradation, puisque nous retrouvons déjà 438 750 coups-minute dans le CO_2 rejeté en 48 heures soit plus du tiers de l'activité des acides aminés. Cette dernière fraction est de loin la plus radioactive. Les protéines ont fixé une activité à peu près aussi importante que celle qui est éliminée sous forme de CO_2 tandis que les acides organiques et la fraction neutre, constituée surtout par les sucres, ne sont que faiblement marqués.

b) *En présence de 2.4.D.*, la répartition de la radioactivité est qualitativement la même qu'en présence d'AIA. Quant à l'intensité de l'absorption de l'arginine et de son utilisation, nous constatons que tous les composés organiques étudiés sont moins radioactifs dans les tissus cultivés sur 2.4.D.

CONCLUSION. — Les conclusions que nous pouvons tirer de ces expériences sont les suivantes :

1° Nous constatons que les tissus de Carotte cultivés *in vitro* assimilent rapidement l'arginine mise à leur disposition dans le milieu de culture.

Après 2 jours de culture, une part importante de cette arginine

qui n'a pas été transformée, se retrouve dans la fraction soluble ; on constate d'autre part une certaine activité dans la citrulline et l'ornithine indiquant que la dégradation se fait avec l'intervention d'arginine dihydrolase et non pas d'arginase comme dans les tissus de Topinambour.

Une grande partie de cette arginine participe à la synthèse des protéines, soit directement, puisque nous retrouvons 30 p. 100 de la radioactivité de la fraction soluble dans les protéines sous forme d'arginine, soit après avoir été transformée en proline, acide aspartique et acide glutamique.

Par contre, cet acide aminé participe peu au métabolisme général de la cellule comme en témoigne la faible radioactivité de la fraction neutre et des acides organiques. Il est également intéressant de noter la teneur relativement élevée des milieux de culture en ornithine qui a diffusé hors des cellules.

2° Le 2.4.D apporte peu de modifications à l'aspect qualitatif de l'utilisation de l'arginine, mais le bilan de la radioactivité incorporée montre un net ralentissement de l'ensemble du métabolisme.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Au moment où nous avons entrepris l'étude de l'influence du 2.4.D sur le métabolisme azoté des tissus végétaux, nous avons eu à résoudre le problème du dosage des acides aminés. Nous avons le choix entre la méthode élégante et précise de chromatographie sur colonne de résine de STEIN et MOORE et diverses techniques basées sur l'élution de chromatogrammes sur papier. Des raisons matérielles nous ont amené à opter pour l'une de ces dernières, celle qui a été décrite par THOMPSON et STEWARD et notre premier travail a été une mise au point de cette technique d'analyse.

Nous avons, en effet, cherché à reproduire les résultats de ces auteurs concernant la colorimétrie des amino-acides sur papier et ceci nous a conduit à préciser que l'intensité de la coloration fournie par la réaction entre l'acide aminé et la ninhydrine augmentait dans les 3 heures qui suivaient la révélation, puis restait stable pendant les 14 heures suivantes. Nous avons ensuite essayé de généraliser la portée de la technique de ces auteurs en l'appliquant à une méthode de séparation chromatographique plus parfaite des acides aminés. Nous avons repris, pour cela, la technique utilisant des papiers tamponnés, décrite par LÉVY et CHUNG, qui nous avait déjà donné de bons résultats qualitatifs. Nous avons finalement mis au point une méthode de dosage permettant de déterminer les acides aminés avec une précision de ± 6 p. 100 à ± 9 p. 100 suivant la qualité de la séparation des taches et leur R_f. Cette méthode relativement simple à mettre en œuvre permet de faire des analyses en série, par exemple six dosages en double, par semaine. Elle reste soumise, cependant, à la qualité du papier utilisé pour la partition et les seuls ennuis que nous ayons constatés au cours de son emploi proviennent d'une irrégularité d'épaisseur des feuilles de papier Whatman.

En possession d'une méthode de dosage des acides aminés, nous avons alors pensé à étudier *in vitro* le comportement d'ensem-

cements primaires de racines de Carotte cultivés sur différents milieux renfermant du 2.4.D. Devant la complexité des réponses obtenues, nous avons renoncé à employer de tels fragments. L'analyse de leurs constituants azotés nous a, d'autre part, montré que les différents tissus de la racine de Carotte avaient une individualité biochimique nette. Nous avons en particulier remarqué une très forte richesse en azote soluble et en azote total, au niveau du cambium. Ces résultats nous ont conduit à chercher un autre matériel, moins irrégulier et nous avons alors songé à utiliser la souche de tissus de Carotte anergiée de GAUTHERET.

Cette souche présente de nombreux avantages sur le matériel précédent, car elle est très homogène ; l'analyse chromatographique nous a montré en outre que la composition de sa fraction aminée soluble est plus simple : l'alanine y occupe une place prépondérante et peut y représenter jusqu'à 40 p. 100 de l'azote soluble.

Nous avons alors étudié le métabolisme azoté de cette souche en fonction de son âge. Une colonie âgée de 60 jours contient 23 milligrammes d'azote aminé soluble et 119 milligrammes d'azote total pour 100 grammes de tissus frais. Trois semaines après le repiquage, ces teneurs atteignent respectivement 109 et 283 milligrammes et leur accroissement considérable témoigne de l'intense activité des tissus, en pleine phase de croissance par division cellulaire. Puis, à mesure que le nombre des divisions diminue, la teneur en azote diminue à son tour, pour revenir aux valeurs initiales.

Au cours de ce travail, nous avons constaté d'autre part que la teneur en azote aminé soluble augmente dans les 12 heures qui suivent la transplantation d'une colonie sur un milieu neuf. Ce phénomène a lieu même lorsqu'on transplante la colonie sur un milieu dépourvu d'azote. Il semble donc dû à une solubilisation de l'azote protéique. Il serait intéressant d'étudier ce phénomène surprenant de manière plus approfondie pour en rechercher les causes qui peuvent être soit la plus grande richesse en sucres du milieu neuf, soit simplement une pression osmotique plus élevée.

Après avoir précisé ces différents points, nous avons pu entreprendre l'étude pharmacodynamique du 2.4.D. Nous nous sommes attachés tout d'abord à rechercher son action sur la teneur en azote aminé soluble : toutes les expériences faites dans ce sens ont montré,

quels que fussent l'âge des colonies, la durée de la transplantation ou la dose d'herbicide, un effet dépressif marqué du 2.4.D sans qu'une modification de nature qualitative fut décelable. Par contre, même à la plus forte concentration essayée, 10^{-6} , l'AIA n'a jamais produit ce phénomène.

Nous avons essayé ensuite de déterminer si cette diminution de la teneur en azote soluble était la conséquence d'une moindre assimilation de l'azote minéral ou d'une plus grande synthèse de protéines : dans tous les cas, les tissus cultivés en présence de 2.4.D sont moins riches en azote total et, de même, leur teneur en nitrate est considérablement plus faible.

L'effet du 2.4.D sur la synthèse des protéines est moins uniforme. Sur des tissus âgés de 7 semaines transplantés sur un milieu contenant des nitrates, il provoque une baisse de la teneur en protéines. Par contre, les tissus jeunes cultivés en présence de 2.4.D. à la concentration de 10^{-6} sont le siège d'une protéosynthèse accrue. Nous avons également remarqué que si la transplantation était faite sur un milieu sans azote la teneur en azote aminé libre diminuait, au bénéfice de l'azote protéique, sous l'influence de la plus faible dose de 2.4.D.

Nous pouvons donc conclure que le 2.4.D freine l'assimilation de l'azote minéral mais qu'il a tendance à augmenter la part de l'azote protéique dans l'azote total.

L'étude de l'incorporation de la glycine 2- ^{14}C ; de l'acide glutamique 3-4 di ^{14}C et de l'arginine uniformément marquée nous a permis de confirmer et de préciser ces premières conclusions. De l'expérience faite avec la glycine marquée, nous retenons que le 2.4.D a favorisé légèrement l'incorporation de la radioactivité dans les protéines au détriment de l'activité de la fraction soluble et que, par ailleurs, la glycine est très rapidement transformée en sérine, ces deux acides étant ensuite les principaux constituants radioactifs des protéines. Par contre, aussi bien avec l'acide glutamique 3-4 di ^{14}C qu'avec l'arginine uniformément marquée, nous avons constaté que l'ensemble des fractions analysées étaient moins radioactives dans les tissus cultivés en présence de 2.4.D. L'expérience avec l'arginine a montré en particulier que non seulement les composés azotés mais

l'ensemble des sucres, des acides organiques et du gaz carbonique rejetés étaient moins riches en ^{14}C .

L'étude de l'incorporation de l'arginine marquée dans les tissus de Carotte nous a permis enfin de mettre en évidence l'existence des produits de dégradation de cette molécule : nous avons trouvé des quantités relativement importantes de citrulline dans la fraction aminée soluble et sa présence, à côté de traces d'ornithine, intermédiaire beaucoup plus rapidement métabolisé, est en faveur de l'existence d'arginine dihydrolase. Ceci est un trait qui contribue à différencier nettement les tissus de Carotte des tissus de Topinambour chez qui, ainsi que l'a montré DURANTON, l'arginase est l'enzyme responsable de la dégradation de l'arginine. Enfin, nous avons noté dans la fraction aminée soluble des tissus cultivés sur arginine, l'apparition d'une quantité faible mais nettement radioactive d'acide guanidobutyrique. Déjà MOREL a signalé l'existence de ce produit d'oxydation de l'arginine dans les tissus tumoraux et l'on peut penser que ce serait un point commun aux tissus qui peuvent se développer en l'absence d'auxine, comme les tissus tumoraux et les tissus anergiés, que de présenter cette voie particulière de dégradation de la molécule d'arginine.

Il semble donc que l'action du 2.4.D sur le métabolisme de l'azote comporte deux phases distinctes. Tout d'abord, sur l'assimilation de l'azote extérieur, que celui-ci soit d'ailleurs constitué par des nitrates ou des acides aminés, cet herbicide exerce une action inhibitrice nette. Ensuite, à l'autre extrémité de la chaîne des réactions du métabolisme de l'azote, la synthèse des protéines est stimulée par les fortes doses de 2.4.D dans les tissus jeunes. Dans tous les cas, la part de l'azote protéique augmente par rapport à l'azote total, en présence de 2.4.D à 10^{-6} . Ce fait est particulièrement net lorsqu'on prive les tissus de toute source extérieure d'azote. On observe alors que le 2.4.D provoque une diminution de la teneur en azote soluble au profit de l'azote protéique.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ABELSON (P. H.). — Amino acid biosynthesis in *Escherichia coli* : isotopic competition with ^{14}C glucose. *J. Biol. Chem.*, 1954, **206**, 335-343.
- (2) AWAPARA (J.). — Application of paper chromatography to the estimation of some free amino acids in tissues of the rat. *J. Biol. Chem.*, 1949, **178**, 113-116.
- (3) BERGER (J.) et AVERY (G.S.). — The mechanism of auxin action. *Science*, 1943, **98**, 454.
- (4) BLOCK (R. J.). — Quantitative estimation of amino acids on paper chromatograms. *Science*, 1948, **108**, 608-609.
- (5) BLOCK (R. J.). — Estimation of amino acids and amines on paper chromatograms. *Anal. Chem.*, **22**, 1327-1332.
- (6) BOISSONNAS (R. A.). — Séparation rapide des acides aminés par chromatographie ascendante bidimensionnelle sur papier. *Helv. Chim. Act.*, 1950, **33**, 1966-1971.
- (7) BONNER (J.). — Plant Biochemistry. Academic Press Inc. Publishers, New York, 1950.
- (8) BONNER (J.) et BANDURSKI (R. S.). — Studies of the physiology, pharmacology and biochemistry of the auxins. *Ann. Rev. of Plant Physiology*, 1952, **3**, 59-87.
- (9) BOROUGHS (H.). — Paper presented to. *Am. Soc. Plant Physio.* (Los Angeles) (cité par BONNER et BANDURSKI (voir ci-dessus, n° 8), 1951.
- (10) BOVÉ (J.) et RAVEUX (R.). — La séparation et la détermination des acides carboxyliques de C¹ à C⁶ par chromatographie de partage sur colonne de silice. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1957, 376-381.
- (11) BULL (H. B.), HAHN (W.) et BAPTIST (V. H.). — Filter paper chromatography. *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, **71**, 550-553.
- (12) BURSTRÖM (H.). — Studies on growth and metabolism of roots. *Physiol. Plant.*, 1951, **4**, 199-208.
- (13) CHINARD (F. P.). — Photometric estimation of proline and ornithine. *J. Biol. Chem.*, 1952, **199**, 91-95.
- (14) CHRISTIANSEN (G. S.) et THIMANN (K. V.). — The metabolism of stem tissue during growth and its inhibition. 1-Carbohydrates. *Arch. Biochem.*, 1950, **26**, 230-259.
- (15) COMMONER (B.), FOGEL (S.) et MULLER (W. H.). — The mechanism of auxin action. The effect of auxin on water absorption by potato tuber tissue. *Am. J. Botan.*, 1943, **30**, 23-27.
- (16) CONSDEN (R.), GORDON (A. H.) et MARTIN (A. J. P.). — Qualitative analysis of proteins : a partition chromatographic method using paper. *Biochem. J.*, 1944, **38**, 224-232.
- (17) COVA (V.). — Culture di tessuti vegetali. IV. Ricerche sul contenuto di zuccheri nelle colture di *Daucus carota*. *Att. Ac. Sc. Torino*, 1943, **78**, 203-220.
- (18) CRAFTS (A. S.). — Herbicides. *Ann. Rev. Plant. Physio.*, 1953, **4**, 253-283.
- (19) DHILLON (A. S.) et LUCAS (E. H.). — Absorption, translocation and persistence of 2,4-D in plants. *Bot. Gaz.*, 1950, **112**, 198-207.
- (20) DURANTON (H.). — Évolution de l'arginine dans le tubercule de Topinambour au cours du cycle végétatif. *C.R. Ac. Sc.*, 1958, **246**, 2655-2657.
- (21) DURANTON (H.). — Étude du métabolisme de l'arginine libre dans les tissus du Topinambour cultivés *in vitro*. *Thèse Science, Paris*, 1958.
- (22) EGGLE (D. R.) et DUNLAP (A. A.). — Responses of Cotton to 2,4-D. *Texas Agr. Exp. Sta. Bull.*, 1949, n° 713.
- (23) ERICKSON (L. C.), SEELY (C. I.) et KLAGES (K. H.). — Effects of 2,4-D upon the protein content of wheats. *J. Am. Soc. Agron.*, 1948, **40**, 659-660.
- (24) FANG (S. C.), JAWORSKI (E. G.), LOGAN (A. V.), FREED (V. H.) et BUTTS (J. S.). — The absorption of radioactive 2,4 Dichlorophenoxyacetic acid and the translocation of ^{14}C by bean plants. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1951, **32**, 249-255.
- (25) FISHER (R. B.), PARSONS (D. A.) et MORRISON (G. A.). — Quantitative paper chromatography. *Nature*, 1948, **161**, 764.

- (26) FOWDEN (L.). — The quantitative recovery and colorimetric estimation of amino-acids separated by paper chromatography. *Biochem. J.*, 1951, **48**, 327-333.
- (27) FREIBERG (S. R.) et CLARK (H. E.). — Effects of 2.4.D. acid upon the nitrogen metabolism and water relations of Soy bean plants grown at different nitrogen level. *Bot. Gaz.*, 1952, **113**, 322-333.
- (28) FREIBERG (S. R.) et CLARK (H. E.). — Changes in nitrogen fractions and proteolytic enzymes of Soy bean plants treated with 2.4.D. *Plant. Physiol.*, 1955, **30**, 39-46.
- (29) FRANK (E. M.), RIKER (A. J.) et DYE (S. L.). — Comparisons of growth by Tobacco and Sunflower tissue on synthetic media containing various sources of organic nitrogen. *Plant. Physiol.*, 1951, **26**, 258-268.
- (30) GALE (E. F.). — The use of enzyme preparation from bacteria for the estimation of amino-acids. *Biochem. J.*, 1947, **41**, VII-IX.
- (31) GASLTON (A. W.). — Sur la relation entre la croissance des cultures de tissus végétaux et leur teneur en catalase. *C.R. Ac. Sc.*, 1951, **232**, 1505-1507.
- (32) GAUTHERET (R. J.). — Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de Carotte. *C.R. Ac. Sc.*, 1939, **208**, 118-120.
- (33) GAUTHERET (R. J.). — La culture des tissus végétaux. Masson, Paris, 1959.
- (34) GOLDWORTHY (P. D.), WINNICK (T.) et GREENBERG (D. M.). — Distribution of ¹⁴C in glycine and serine of liver protein following the administration of labeled glycine. *J. Biol. Chem.*, **180**, 341-343.
- (35) GORIS (A.). — Épuisement des réserves glucidiques de souches de tissus et de fragments de tubercules de Carotte maintenus *in vitro* sur milieux dépourvus de sucres. *C.R. Ac. Sc.*, 1948, **226**, 105-107.
- (35 bis) GORIS (A.). — Épuisement des réserves glucidiques de fragments de tubercules de Topinambour cultivés *in vitro* sur milieux dépourvus de sucres ; influence de l'acide indole-3-acétique. *C.R. Ac. Sc.*, 1948, **226**, 742-744.
- (36) GORIS (A.). — Influence comparée de l'acide indole acétique et du lait de Coco sur les réserves glucidiques de souches de tissu de Carotte. *C.R. Ac. Sc.*, 1950, **231**, 870-872.
- (37) HACKETT (D. P.) et THIMANN (K. V.). — The action of inhibitors on water uptake by potato tissue. *Plant. Physiol.*, 1950, **25**, 648-653.
- (38) HAGEN (C. F.), CLAGETT (C. O.) et HELGESON (E. A.). — 2.4. Dichlorophenoxyacetic acid inhibition of Castor Bean lipase. *Science*, 1949, **110**, 116-117.
- (39) HELGESON (E. A.), BLANCHARD (K. L.) et SIBBITT (L. D.). — *N. Dakota Agr. Expt. Sta. Bimonthly Bull.*, 1948, **10**, 166-170.
- (40) JUTISZ (M.). — Chromatographie et détermination colorimétrique de certains acides aminés. in Loiseleur. Techniques de laboratoire, Masson et C^{ie}. édit., 2^e édition, 930 p., t. I, 1954, 638-675.
- (41) KLINGMAN (G. C.) et AHLGREEN (G. H.). — Effects of 2.4.D. on dry weight, reducing sugars, total sugars, polysaccharides, nitrogen and allyl sulfide in Wild Garlic (*Allium vineale* L.). *Bot. Gaz.*, 1951, **113**, 119-134.
- (42) KULESHA (Z.). — Recherches sur l'élaboration de substances de croissance par les tissus végétaux. *Thèse Paris*, 1951.
- (43) KWAMME (O. J.), CLAGETT (C. O.) et TREUMANN (W. B.). — Kinetics of the action of the sodium salt of 2.4. Dichlorophenoxyacetic acid on the germ lipase of the wheat. *Arch. Biochem.*, 1949, **24**, 321-328.
- (44) LACHAUX (M.). — Respiration des tissus des tubercules de Carotte et de Topinambour. Influence du glucose et de l'acide indole-3-acétique. *C.R. Ac. Sc.*, 1944, **219**, 244-246.
- (45) LÉVY (A. L.) et CHUNG (G. D.). — Two dimensional chromatography of amino-acids on buffered papers. *Anal. Chem.*, 1953, **25**, 396-399.
- (46) LIORET (C.). — Recherches sur le métabolisme des cultures de tissus normaux et pathologiques. *Ann. Biol.*, 1955, **31**, 185-194.
- (46 bis) LIORET (C.). — Sur le métabolisme de l'acide glutamique dans les tissus de Crown-gall de Scorsonères cultivés *in vitro*. *C.R. Ac. Sc.*, 1957, **245**, 1329-1331.
- (47) LUECKE (R. W.), HAMNER (C. L.) et SELL (H. M.). — Effect of 2.4. Dichlorophenoxyacetic acid on the content of Thiamine, Riboflavin, Nicotinic acid, Pantothenic acid and Carotene in stems of leaves of Red Kidney bean plants. *Plant. Physiol.*, 1949, **24**, 546-548.
- (48) LYMAN (C. M.), KUIKEN (K. A.), NORMAN (W. H.) et HALE (F.). — Microbiological determination of amino-acids. *Science*, 1943, **98**, 266.
- (49) MAC PHERSON (H. T.). — The basic amino-acids content of proteins. *Biochem. J.*, 1946, **40**, 470-481.

- (50) MÉNORET (Y.). — Les acides aminés libres de la racine de Carotte et leur évolution au cours de la culture des tissus *in vitro*. *C.R. Ac. Sc.*, 1957, **244**, 488-489.
- (51) MÉNORET (Y.) et MOREL (G.). — Influence de l'acide 2.4.Dichlorophenoxyacétique sur le métabolisme des acides aminés libres de tissus de Carotte cultivés *in vitro*. *C.R. Ac. Sc.*, 1958, **246**, 2652-2655.
- (52) MILLER (T. H.) et BURRIS (R. H.). — Effect of plant growth substances upon oxidation of ascorbic and glycolic acids by cell-free enzymes from Barley. *Am. J. Bot.*, 1951, **38**, 547-549.
- (53) MITCHELL (J. W.) et BROWN (J. W.). — Effect of 2.4.Dichlorophenoxyacetic acid on the readily available carbohydrate constituents in annual Morning Glory. *Bot. Gaz.*, 1945, **107**, 120-129.
- (54) MOORE (S.) et STEIN (W. H.). — Chromatography of amino-acids on sulfonated polystyrene resins. *J. Biol. Chem.*, 1951, **192**, 663-681.
- (55) MOREL (G.) et DEMETRIADES (S.). — Action de régulateurs de croissance sur l'activité oxydasique de tissus de Topinambour. *Ann. Biol.*, 1955, **31**, 227-236.
- (56) MOREL (G.) et DURANTON (H.). — Le métabolisme de l'arginine par les tissus végétaux. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, **40**, 2155-2167.
- (57) MORRIS (M. P.) et GONZALES-MAS (A.). — Simple colorimetric method for the determination of nitrates in forage crops. *Ag. and Food Chem.*, 1958, **6**, 456.
- (58) NEELY (B. B.), BALL (C. D.), HAMNER (C. L.) et SELL (H. M.). — Effect of 2.4. Dichlorophenoxyacetic acid on the invertase, phosphorylase and pectin methoxylase activity in the stems and leaves of the Red Kidney bean plants. *Plant. Physiol.*, 1950, **25**, 525-528.
- (59) NICKELL (L. G.). — Effect of certain plant hormones and colchicine on the growth and respiration of virus tumor tissue from *Rumex acetosa*. *Amer. Journ. Bot.*, 1950, **37**, 829-835.
- (60) NORMAN (A. G.), MINARIK (C. E.) et WEINTRAUB (R. L.). — Herbicides. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 1950, **1**, 141-169.
- (61) NUTMAN (P. S.), THORNTON (H. G.) et QUASTEL (J. H.). — Inhibition of plant growth by 2.4. Dichlorophenoxyacetic acid and other plant-growth substances. *Nature*, 1945, **155**, 498-500.
- (62) OSBORNE (T. B.) et MENDEL (L. B.). — Amino-acids in nutrition and growth. *J. Biol. Chem.*, 1914, **17**, 325-349.
- (63) VAN OVERBEEK (J.). — Agricultural application of growth regulators and their physiological basis. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 1952, **3**, 87-109.
- (64) VAN OVERBEEK (J.), BLONDEAU (R.) et HORNE (V.). — Difference in activity between 2.4.Dichlorophenoxyacetic acid and other auxins and its significance in herbicidal action. *Plant. Physiol.*, 1951, **26**, 687-697.
- (65) PAYNE (M. G.), FULTS (J. L.) et HAY (R. J.). — Free amino-acids in potato tubers altered by 2.4.D. treatment of plants. *Science*, 1951, **114**, 204-205.
- (66) PAYNE (M. G.), FULTS (J. L.), HAY (R. J.) et LIVINGSTONE (C. H.). — Protein content and specific gravity of Red Mac Clure potatoes increased by 2.4.D treatments. *Amer. Potato Jour.*, 1956, **30**, 46-49.
- (67) PETERSON (D. H.) et REINEKE (L. M.). — The chemistry of circulin : chromatographic isolation of the amino-acid constituents with powdered cellulose. *J. Biol. Chem.*, 1949, **181**, 95-108.
- (68) POPE (C. G.) et STEVENS (M. F.). — The determination of amino-nitrogen using a copper method. *Biochem. J.*, 1939, **33**, 1070-1077.
- (69) RACUSEN (D. W.). — The incorporation of ¹⁴C into leaf amino acids and proteins. *Doctoral Thesis* (Iowa State College, Ames, Iowa), 1953.
- (70) REBSTOCK (T. L.), HAMNER (C. L.), BALL (C. D.) et SELL (H. M.). — Effect of, 2.4.Dichlorophenoxyacetic acid on proteolytic activity of Red Kidney bean plants. *Plant. Physiol.*, 1952, **27**, 639-643.
- (71) REDFIELD (R. R.) et BARRON (E. S. G.). — Quantitative determination of amino-acids in proteins hydrolyzates by paper chromatography. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, **35**, 443.
- (72) RHODES (A.), TEMPLEMAN (W. G.) et THRUSTON (M. N.). — The effect of the plant growth regulator 4-chloro-2-methyl phenoxy-acetic acid on the mineral and nitrogen contents of plants. *Ann. Botany*, 1950, **14**, 181-198.
- (73) RIKER (A. J.) et GUTSCHE (A. E.). — The growth of sunflower tissue *in vitro* on synthetic media with various organic and inorganic sources of Nitrogen. *Amer. J. Botany*, 1948, **35**, 227-238.

- (74) SELL (H. M.), LUECKE (R. W.), TAYLOR (B. M.) et HAMNER (C. L.). — Changes in chemical composition of the stems of Red Kidney bean plants, treated with 2.4.Dichlorophenoxyacetic acid. *Plant. Physiol.*, 1949, **24**, 295-299.
- (75) SIEKEVITZ (P.) et GREENBERG (D. M.). — The biological formation of serine from glycine. *J. Biol. Chem.*, 1949, **180**, 845-856.
- (76) STEWARD (F. C.), CAPLIN (S. M.) et MILLAR (F. K.). — Investigations on growth and metabolism of plant cells: I. New techniques for the investigations of metabolism, nutrition and growth in undifferentiated cells. *Ann. Bot. (London)*, 1952, **16**, 57-77.
- (77) STEWARD (F. C.), BIDWELL (R. S. G.) et YEMM (E. W.). — Protein metabolism, respiration and growth: a synthesis of results from the use of ^{14}C labelled substrates and tissue cultures. *Nature*, 1956, **178**, 734-738, 789-792.
- (78) STOKES (J. L.) et GUNNESS (M.). — Microbiological methods for the determination of amino-acids I. Aspartic acid and serine. *J. Biol. Chem.*, 1945, **157**, 651-659.
- (79) SWANN (M. H.) et ADAMS (M. L.). — Rapid colorimetric method for nitrates. *Anal. Chem.*, 1956, **28**, 1630.
- (80) THIMANN (K. V.), BONNER (W. D.) et CHRISTIANSEN (G. S.). — Plant Growth Substances. Univ. Wisconsin Press. 1951.
- (81) THOMPSON (J. F.), ZACHARIUS (R. M.) et STEWARD (F. C.). — Investigations on nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants: I. The reaction of nitrogen compounds with Ninhydrin on paper: a quantitative procedure. *Plant. Physiol.*, 1951, **26**, 375-398.
- (82) THOMPSON (J. F.) et STEWARD (F. C.). — Investigations on nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants: II. Variables in two directional paper chromatography of amino-acids: a quantitative procedure. *Plant. Physiol.*, 1951, **26**, 421-441.
- (83) WELLER (L. E.), LUECKE (R. W.), HAMNER (C. L.) et SELL (H. M.). — Changes in chemical composition of the leaves and roots of Red Kidney bean plants treated with 2.4.Dichlorophenoxyacetic acid. *Plant. Physiol.*, **25**, 289-293.
- (84) WEINTRAUB (R. L.). — 2.4.D Mechanisms of action. *Ag. and Food Chemistry*, 1953, **1**, 250-254.
- (85) WIGGANS (S. S.). — Growth and organ formation in callus tissues derived from *Daucus Carotta*. *Amer. J. Botan.*, 1954, **41**, 321-326.
- (86) WORT (D. J.). — The response of Buckwheat to treatment with 2.4.Dichlorophenoxyacetic acid. *Amer. J. Botan.*, 1949, **36**, 673-676.
- (87) YAKUSHKINA (N. I.). — (Cité par WEINTRAUB (84)), *Doklady Akad. Nank. S.S.S.R.*, 1948, **61**.
- (88) YASUDA (G. K.), PAYNE (M. G.) et FULTS (J. L.). — Effect of 2.4.Dichlorophenoxy acetic acid and maleic hydrazide on potato proteins as shown by paper electrophoresis. *Nature*, 1955, **176**, 1029-1030.
-

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Formation, propriétés et rôle possible des complexes
entre amino-acides et polynucléotides

Vu et approuvé :

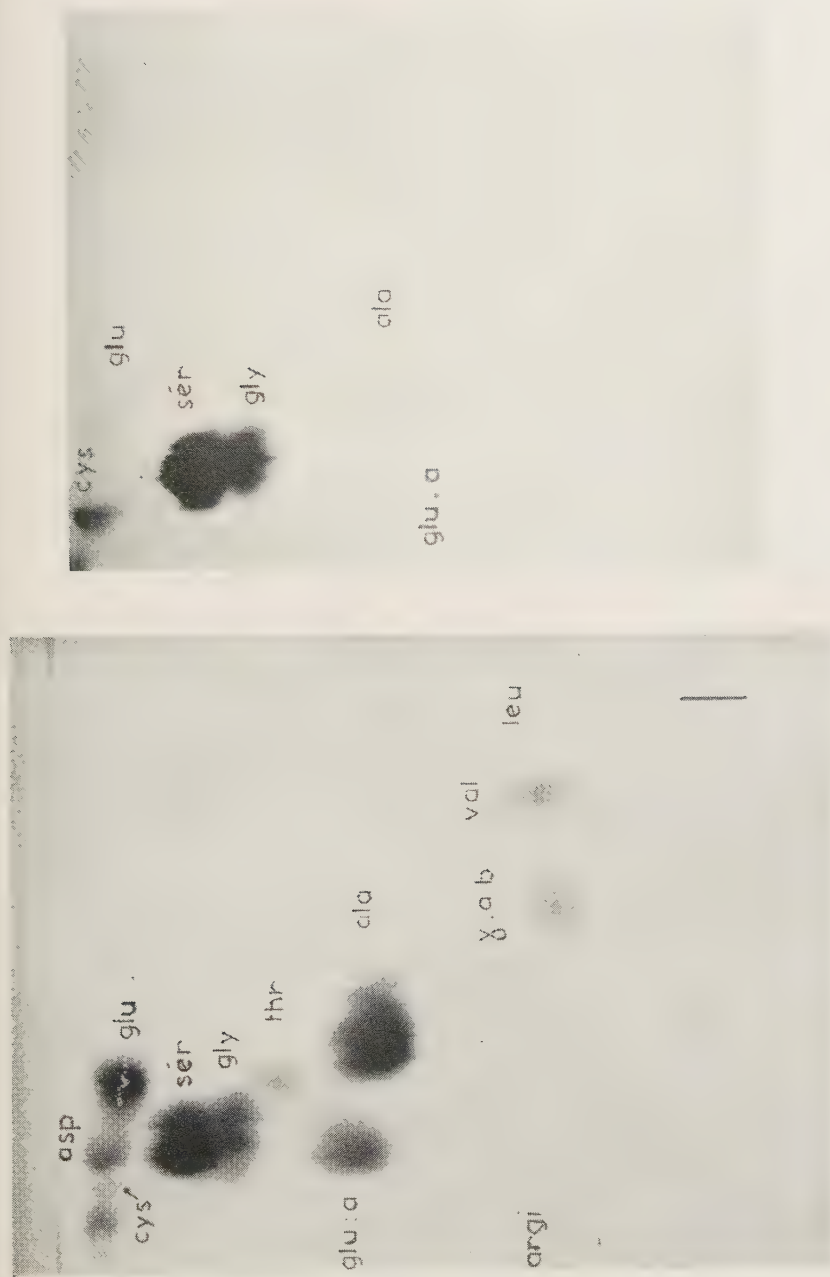
Paris, le 18 janvier 1960.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
J. PERES.

Vu

et Permis d'imprimer :

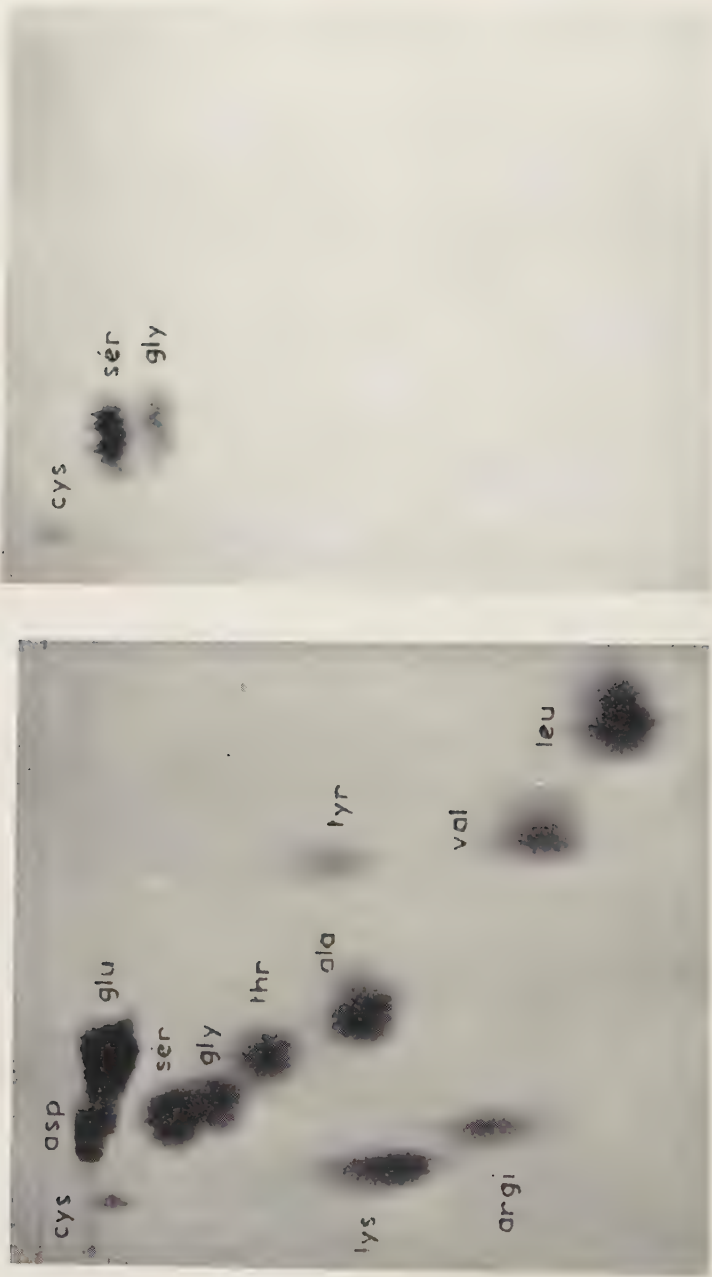
Le Recteur de l'Académie
de Paris,
Jean SARRAILH.



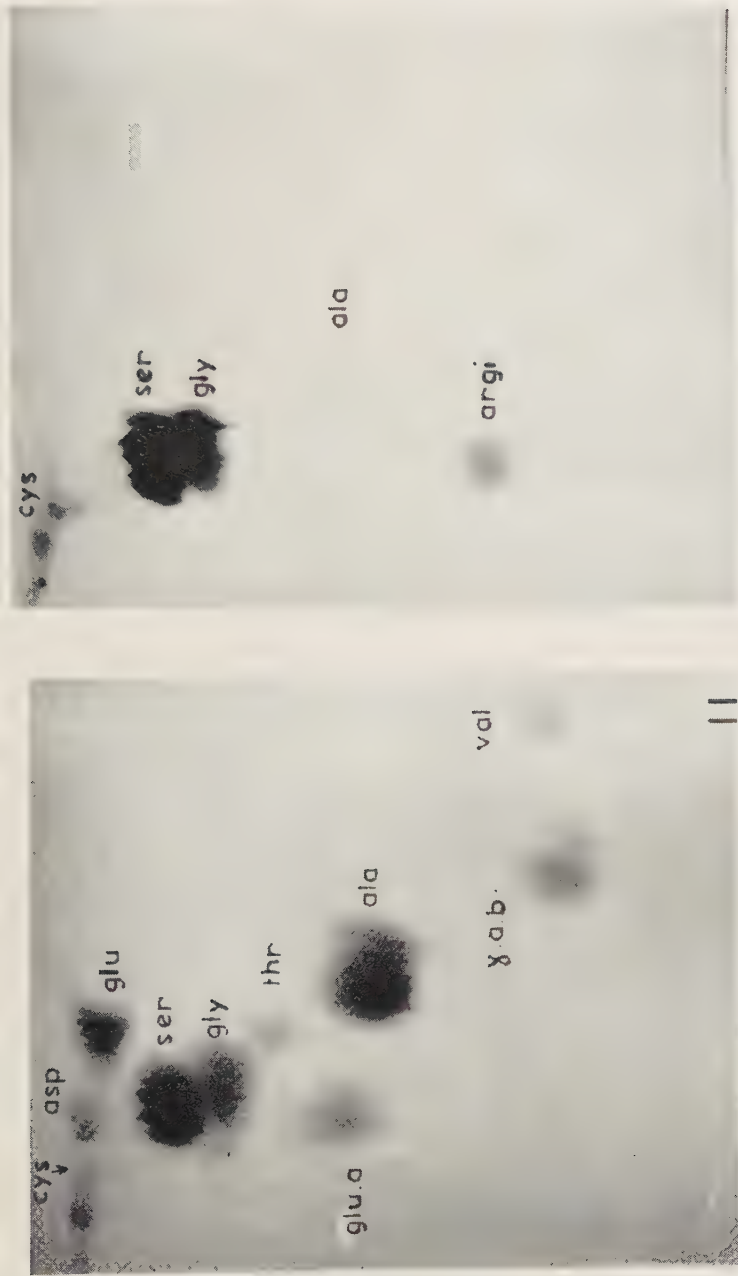
Pl. I. — Métabolisme de la GLYCINE, 2-¹⁴C dans la souche de *Carotte* cultivée deux jours in vitro en présence d'AIA à la concentration de 10^{-8} ;

— à gauche : chromatogramme des AMINO-ACIDES LIBRES ;

- à droite : autoradiogramme correspondant.



Pl. II. — Métabolisme de la GLYCINE $2-^{14}\text{C}$ dans la souche de Carotte cultivée deux jours in vitro en présence d'AIA à la concentration de 10^{-8} ;
 — à gauche : chromatogramme d'un HYDROLYSAT DE PROTÉINES ;
 — à droite : autoradiogramme correspondant.

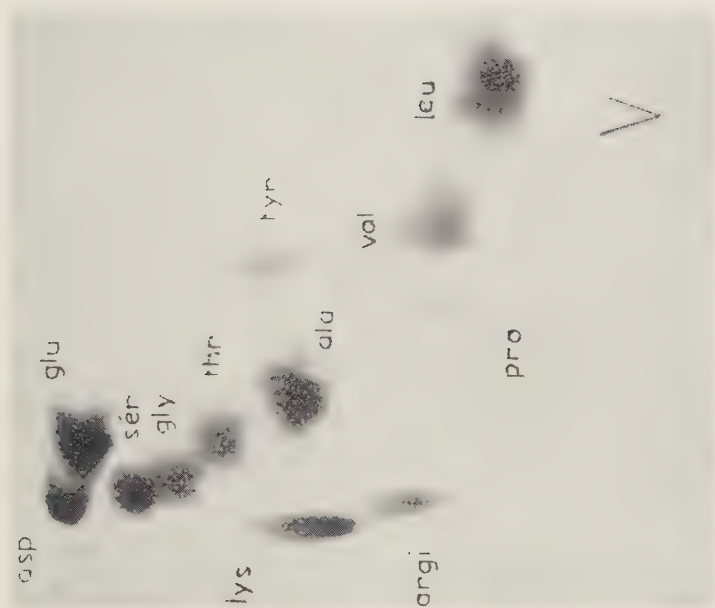


Pl. III. — Métabolisme de la GLYCINE $2\text{-}^{14}\text{C}$ dans la souche de Carotte cultivée deux jours in vitro en présence de 2, 4, D à la concentration de 10^{-6} ;
 — à gauche : chromatogramme des AMINO ACIDES LIBRES ;
 — à droite : autoradiogramme correspondant. Noter que le 2, 4, D, a favorisé la fixation de ^{14}C au niveau de l'arginine.

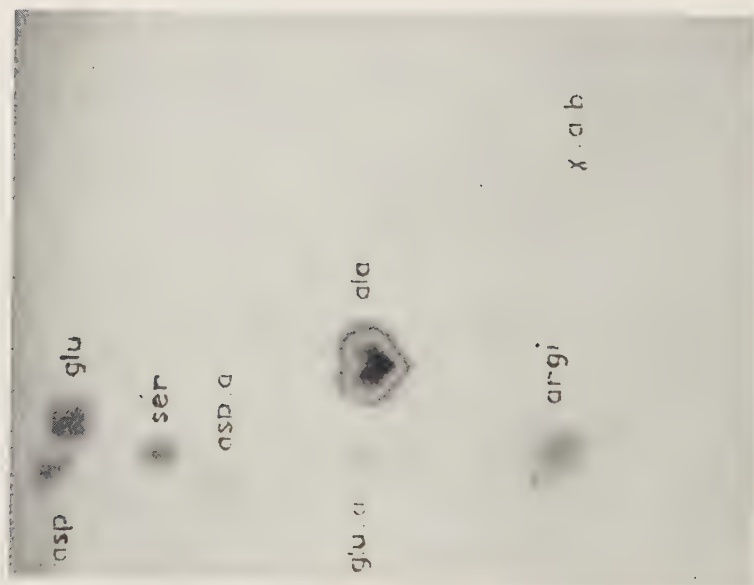


Pl. IV. — Métabolisme de l'ACIDE GLUTAMIQUE 3,4-d¹³C dans la souche de tissus de Carotol cultivée deux jours in vitro en présence d'AIA à la concentration de 10^{-8} ;

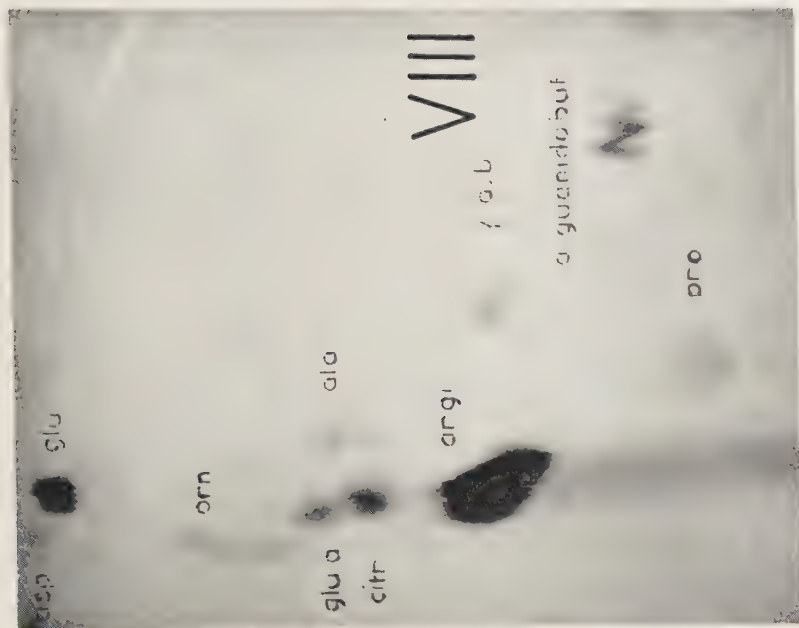
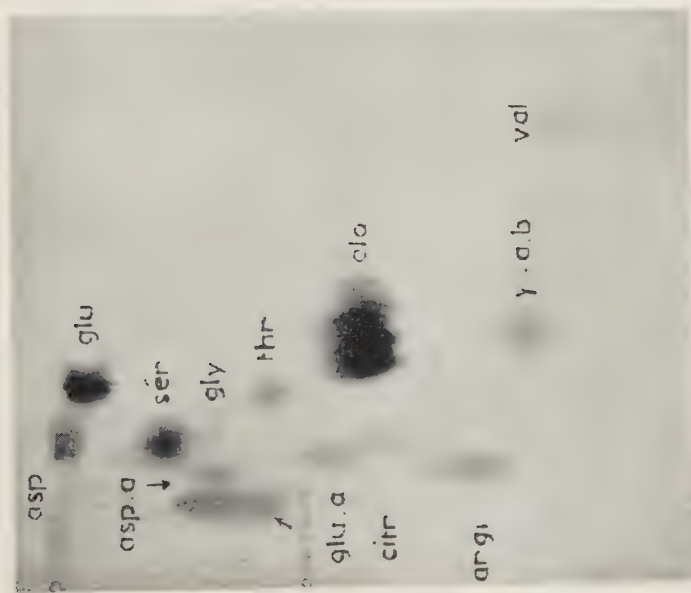
à gauche : chromatogramme des AMINO ACIDES LIEGES. A droite les trois points les plus intenses correspondent à l'acide glutamique, à l'acide aspartique et à l'acide alanine. La tache d'acide glutamique est fortement radioactive.



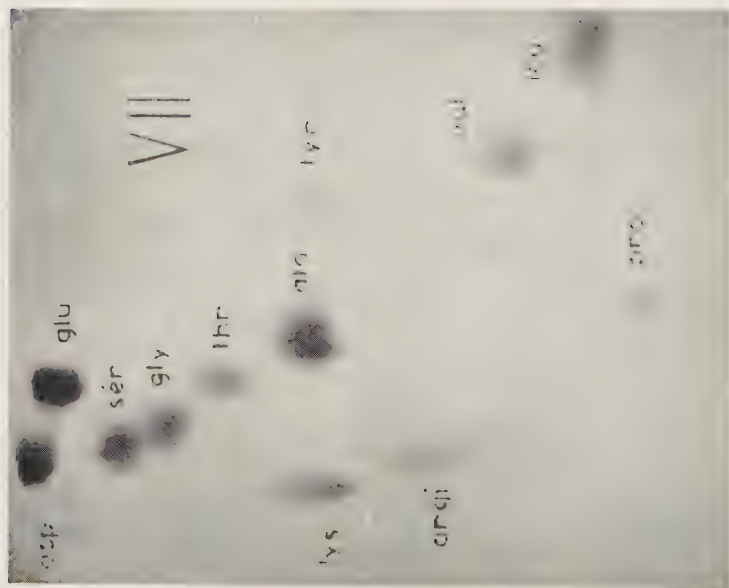
PL. V. — Métabolisme de l'ACIDE GLUTAMIQUE 3,4-di ¹⁴C dans la souche de *Carotte* cultivée deux jours in vitro en présence d'AIA à la concentration de 10⁻³ ;
 — à gauche : chromatogramme d'un HYDROLISAT DE PROTÉINES ;
 — à droite : autoradiogramme correspondant. Noter la radioactivité de l'acide aspartique, pratiquement inexistante dans la fraction soluble.



PL. VI. — Métabolisme de l'ARGININE uniformément marquée par le ^{14}C dans la souche de tissus de Carotte cultivée deux jours *in vitro* en présence d'ALA à la concentration de 10^{-8} ; — à gauche : chromatogramme des AMINO-ACIDES LIBRES. Noter la forte tache d'arginine ; — à droite : autoradiogramme correspondant. On observe que la citrulline et l'ornithine sont fortement radioactives.



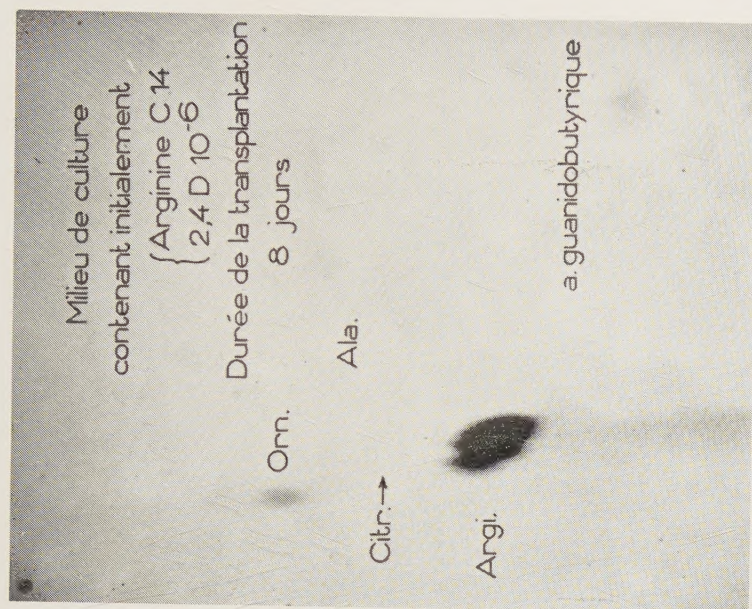
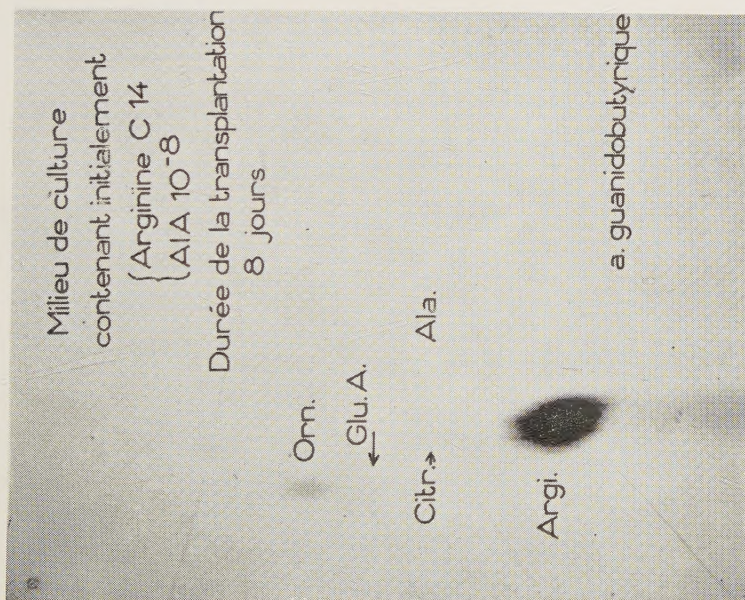
PL. VII. — Métabolisme de l'ARGININE uniformément marquée par le ^{14}C (même extrait d'acides aminés libres que pl. VI) :
 — à gauche : chromatogramme avec surcharge l'échantillon d'ornithine non radioactive ;
 — à droite : autoradiogramme correspondant. La tache témoin se superpose exactement à la tache radioactive de l'ornithine de l'extrait.



PL. VIII. — Métabolisme de l'ARGININE uniformément marquée par le ^{14}C dans la souche de *Issus de Carotte* cultivée deux jours *in vitro* en présence d'ATA à la concentration de 10^{-8} ;

— à gauche chromatogramme d'un HYDROLYSAT DE PROTÉINES

— à droite | autoradiogramme correspondant. Noter la radioactivité de la proline et de l'acide aspartique.



Pl. IX. — Autoradiogrammes des milieux de culture à la fin de l'expérience.

